

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biologických a lékařských věd



**Imunohistochemická analýza exprese fosforylované formy Smad2 po  
podávání atorvastatinu u experimentální aterogeneze**

**Immunohistochemical analysis of expression of phosphorylated form  
Smad2 after administration of atorvastatin in experimental  
atherogenesis**

Rigorózní práce

Konzultant rigorózní práce:

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD

Vypracovala:

Mgr. Lucie Vybulková

Hradec Králové 2011

„Tímto prohlašuji, že jsem rigorózní práci zpracovala samostatně a použila pouze literaturu a další zdroje uvedené v seznamu použité literatury.“

„Ráda bych poděkovala Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD. za cenné rady a připomínky při vypracování této rigorózní práce. Poděkování patří i mé rodině za jejich podporu a vytvoření potřebného zázemí.“

## **Abstrakt:**

Lucie Vybulková

Imunohistochemická analýza exprese fosforylované formy Smad2 po podávání atorvastatinu u experimentální aterogeneze

Rigorózní práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

### **Cíl práce:**

Cílem této rigorózní práce bylo popsat vliv atorvastatinu na expresi fosforylované formy Smad2 v aterosklerotických plátech ApoE/LDLr-deficitních myší pomocí imunohistochemických metod. Dále byl sledován vliv atorvastatinu na spektrum lipidů a velikost aterosklerotických plátů.

### **Metody:**

V experimentu byly použity samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru. Byla u nich provedena biochemická analýza vzorků krve, histologické barvení olejovou červení k detekci lipidů ve tkáních, kvantitativní analýza velikosti lézí a imunohistochemická analýza vzorků aorty se semilunárními chlopněmi pro detekci exprese Smad2 s využitím metodiky Avidin-Biotin a detekcí pomocí DAB.

### **Výsledky:**

Při biochemické analýze jsme potvrdili nárůst hladin celkového cholesterolu a VLDL po podávání atorvastatinu. Kvantifikací aterosklerotických lézí byla zjištěna menší velikost lézí u ATV skupiny myší. Imunohistochemickou analýzou jsme prokázali expresi fosforylované formy Smad2 v tunica adventitia, tunica media, v aterosklerotických lézích a v endotelu. Exprese Smad2 byla výraznější u skupiny ATV.

### **Závěr:**

Podávání atorvastatinu vedlo ke zvýšení exprese Smad2, což by mohlo přispívat k antiaterogenním účinkům statinů.

## **Abstract:**

Lucie Vybulková

Immunohistochemical analysis of expression of phosphorylated form Smad2 after administration of atorvastatin in experimental atherogenesis.

Thesis

Charles University in Prague, Faculty of pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

### **Background:**

The aim of this thesis was to describe the effects of atorvastatin treatment on the expression of phosphorylated form of Smad2 in atherosclerotic plaques in ApoE/LDLr-deficient mice by immunohistochemical methods. Furthermore, the influence of atorvastatin on lipid spectrum and size of atherosclerotic plaques was observed.

### **Methods:**

In our experiment there were used C57BL/6J female mice with double deficit of apolipoprotein E and LDL receptor. There was performed the biochemical analysis of blood samples, histological staining with oil red for detection of tissue lipids, quantitative analysis of size of lesions and immunohistochemical analysis of samples containing semilunar valves and aorta for the detection of expression of Smad2. It was done using the method Avidin-Biotin and detection with DAB.

### **Results:**

Using biochemical analysis we confirmed increased levels of total cholesterol and VLDL after the administration of atorvastatin. Smaller size of atherosclerotic lesions was found in ATV group of mice. Immunohistochemical analysis demonstrated the expression of phosphorylated form of Smad2 in tunica adventitia, tunica media, in atherosclerotic lesions and in endothelium. The expression of Smad2 was stronger after atorvastatin treatment.

### **Conclusion:**

The administration of atorvastatin resulted in increase of expression of Smad2; this could contribute to antiatherogenic effects of statins.

# Obsah

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2. ATEROSKLERÓZA .....</b>	<b>9</b>
2.1. Rizikové faktory .....	9
2.2. Lipidy a lipoproteiny .....	12
2.3. Úloha klíčových lipoproteinů v patogenezi aterosklerózy .....	15
2.4. Cévní stěna a úloha endotelu v patogenezi aterosklerózy.....	16
2.5. Úloha monocytů-makrofágů .....	18
2.6. Úloha hladkých svalových buněk a lymfocytů .....	20
2.7. Vývojová stadia aterosklerózy .....	20
2.8. Typy aterosklerotických plátů.....	23
<b>3. SMAD PROTEINY A JEJICH VÝZNAM V PROCESU ATEROGENEZE.....</b>	<b>24</b>
3.1. Transformující růstový faktor .....	24
3.2. Smad proteiny .....	25
3.2.1. Smad2.....	26
<b>4. STATINY .....</b>	<b>28</b>
4.1. Mechanismus účinku.....	28
4.2. Farmakokinetika.....	29
4.3. Lékové interakce .....	29
4.4. Nežádoucí účinky .....	30
4.5. Pleiotropní účinky statinů .....	30
<b>5. MODELÝ ATEROSKLERÓZY .....</b>	<b>34</b>
5.1. Myší modely aterosklerózy: .....	34
5.1.1. Apolipoprotein E-deficitní myši .....	35
5.1.2. LDL-receptor deficitní myši .....	36
<b>6. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>37</b>
<b>7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>38</b>
7.1. Zvířata a použitá dieta .....	38
7.2. Biochemická analýza .....	38
7.3. Histologické barvení olejovou červení.....	39
7.4. Kvantitativní analýza barvení olejovou červení.....	39
7.5. Imunohistochemie .....	40
7.6. Statistická analýza .....	42

<b>8. VÝSLEDKY .....</b>	<b>43</b>
8.1. Biochemická analýza hladin cholesterolu u myší .....	43
8.2. Kvantifikace velikosti aterosklerotických lézí .....	44
8.3. Imunohistochemické barvení u myší .....	47
<b>9. DISKUZE.....</b>	<b>49</b>
<b>10. ZÁVĚR .....</b>	<b>51</b>
<b>11. SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>52</b>
<b>12. POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>54</b>

# 1. ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou nejčastější příčinou morbidity a mortality v industrializovaných zemích. Česká republika patří mezi státy s největší úmrtností na tyto onemocnění. Kromě toho onemocnění kardiovaskulárního systému vedou také ke zvýšení morbidity a pracovní neschopnosti, čímž dochází k růstu finančních výdajů na zdravotní péči (1).

Za nejčastější příčinu KVO je považována ateroskleróza. Jedná se o zánětlivé onemocnění charakterizované ukládáním lipidů v cévní stěně převážně středních a velkých artérií. Tak vznikají aterosklerotické léze, které později vedou k manifestaci klinických projevů aterosklerózy. Těmi jsou v závislosti na postižené oblasti všechny formy ischemické choroby srdeční, ischemická choroba dolních končetin, cévní mozková příhoda aj. (2,3). Existují místa, která jsou náchylnější ke vzniku aterosklerotických změn – např. oblast větvení artérií (4).

Ovlivnění rizikových faktorů zůstává na prvním místě ve snaze redukovat výskyt KVO. Mezi ovlivnitelné rizikové faktory lze zařadit arteriální hypertenzi ( $TK \geq 140/90$ ), hyperlipidémii (celkový cholesterol  $\geq 5\text{ mmol/l}$ , LDL  $\geq 3\text{ mmol/l}$ , HDL  $\leq 1\text{ mmol/l}$  a TAG  $\geq 2\text{ mmol/l}$ ), diabetes mellitus nebo poruchu glukózové tolerance, obezitu, kouření či nedostatek fyzické aktivity (1). Diskutován je např. i vliv zvýšené hladiny homocysteinu.

Mezi faktory, které nelze ovlivnit, patří věk, mužské pohlaví a genetické dispozice.

Prevence u asymptomatických jedinců se nazývá primární. Zahrnuje komplexní ovlivnění všech modifikovatelných rizikových faktorů s cílem zabránit vzniku aterosklerózy a jejím klinickým manifestacím. Sekundární prevencí se rozumí prevence u jedinců s prokazatelným KVO s cílem zabránit či zpomalit progresi onemocnění (2).

Odhad KV rizika se provádí nejnověji na základě tabulek SCORE, které určují desetileté riziko úmrtí na KVO v České republice. K určení je třeba znát hodnoty systolického krevního tlaku, celkového cholesterolu, pohlaví, věk a kuřáctví. Za vysoké KV riziko je pak považováno riziko kardiovaskulárního úmrtí  $\geq 5\%$  (1). Existují ale i faktory, které vypočtené riziko dále zvyšují, patří mezi ně např. nižší HDL-cholesterol, vyšší hladina triacylglycerolů, pozitivní rodinná anamnéza, porušená glukózová tolerance, fyzická inaktivita a jiné (5).



## 2. ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je chronické zánětlivé onemocnění charakterizované akumulací lipidů v cévní stěně. Dříve bylo za hlavní příčinu považováno degenerativní postižení arteriální stěny, které předpokládalo mechanické ukládání částic cholesterolu a postupný vznik aterosklerotických plátů zužujících cévní lumen.

Podle výsledků novějších studií se ale dnes přistupuje k názoru, že ateroskleróza je zánětlivé onemocnění, které je charakteristické přítomností zánětlivých buněk (monocyty-makrofágy, lymfocyty) a zánětlivých mediátorů uvolňovaných aktivovanými endotelovými buňkami a buňkami hladké svaloviny (2).

Za spouštěcí faktor aterogeneze je považována endoteliální dysfunkce. Ta vzniká působením rizikových faktorů aterosklerózy (viz dále). Je dnes považována za reverzibilní stupeň, který předchází morfologickým změnám arteriální stěny (6).

### 2.1. Rizikové faktory

Rizikové faktory aterosklerózy můžeme z hlediska možnosti jejich modifikace rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Dále jsou popsány faktory, jejichž přímá souvislost není ještě spolehlivě prokázána.

**Tab. 1: Rizikové faktory aterosklerózy (7)**

Tab. 1 – Rizikové faktory pro aterosklerózu		
Ovlivnitelné	Neovlivnitelné	Zatím s otazníkem
vysoký celkový cholesterol a LDL-cholesterol, TAG	pozitivní rodinná anamnéza ICHS, CMP	infekce (chlamydie, <i>Helicobacter pylori</i> , cytomegalovirus)
nízký HDL-cholesterol	mužské pohlaví	hladina homocysteinu
hypertenze	lipoprotein (a)	nízká porodní hmotnost
obezita		
diabetes mellitus		
trombogenní faktory		
kouření cigaret		
nízká tělesná aktivita		
CMP – cévní mozková příhoda, ICHS – ischemická choroba srdeční, TAG – triacylglyceroly		

### Neovlivnitelné faktory: (2)

- *Věk* – u mužů > 45 let, u žen > 55let
- *Pohlaví* – vyšší riziko KVO u mužů, vzhledem k absenci ochranného působení estrogenů, riziko u žen se zvyšuje po menopauze
- *Genetické dispozice*

### Ovlivnitelné faktory:

- *Hypertenze* (AH) – arteriální hypertenze je řazena mezi civilizační onemocnění s prevalencí v dospělé populaci mezi 30-35%. Závislost se mezi hodnotou TK a kardiovaskulární morbiditou a mortalitou byla jednoznačně prokázána metaanalýzou populačních studií (2). Za hypertenzi je považována hodnota TK > 140/90 mm Hg. Riziko KVO se zvyšuje lineárně se vzrůstajícím TK (8). Hypertenzi je nutno léčit včas, než dojde ke vzniku ireverzibilních změn (9). Při hypertenzi mohou být zvýšené hladiny angiotensinu II (AII), který má silné vazokonstrikční účinky. Zároveň také stimuluje uvolňování aldosteronu a proliferaci buněk hladké svaloviny (3).

- *Dyslipidémie* – jedná se o metabolickou poruchu charakterizovanou změnou koncentrací lipidů a lipoproteinů v krvi. Nejčastěji se může jednat o zvýšení LDL či TAG (=hyperlipoproteinémie), nebo naopak mohou být i snížené hodnoty HDL. Zvýšené hodnoty proaterogenních lipidů je nutné pečlivě regulovat, jelikož jsou výrazným rizikovým faktorem aterogeneze. Snížení KV rizika redukcí hladin LDL-cholesterolu bylo opakovaně prokázáno v klinických studiích. U žen v premenopauzálním období lze pozorovat ochranný vliv estrogenů a nižší hladiny LDL (10). Endotelovou funkci ovlivňují především chemicky modifikované LDL, které prostupují do stěny cév.

Dyslipidémie lze rozdělovat podle více hledisek. Mohou být dyslipidémie vrozené či sekundární, které jsou vyvolány jiným onemocněním. Na hladiny lipidů má také značný vliv životospráva – jmenovitě způsob stravování, nadváha, alkohol, fyzická inaktivita a kouření (8). Mezi nejzávažnější vrozené dyslipidémie se řadí familiární hypercholesterolémie a familiární defekt apoB. Jsou vyvolány defektem genu pro LDL-receptor či genu pro apolipoprotein B. Tito nemocní se prezentují vysokými hladinami LDL-cholesterolu při současně normální hladině TAG a jsou odkázáni na celoživotní

intenzivní farmakoterapii (8). Tyto dyslipidémie jsou velmi nebezpečné, jelikož značně zvyšují riziko časně manifestace KVO.

Sekundární dyslipidémie se mohou vyskytovat např. v souvislosti s hypotyreózou, diabetem či jaterním a ledvinovým onemocněním. Mohou je způsobit i některé léky jako imunosupresiva, glukokortikoidy, neselektivní beta-blokátory aj.

V primární prevenci by mělo být optimálně dosahováno cílových hodnot celkového cholesterolu  $< 5,0 \text{ mmol/l}$ , LDL  $< 3 \text{ mmol/l}$ , TAG  $< 2,0 \text{ mmol/l}$  a HDL  $> 1,0 \text{ mmol/l}$ . V sekundární prevenci KVO jsou kritéria ještě přísnější (8).

- *Diabetes mellitus (DM)* – jedná se o chronické onemocnění charakterizované absolutním nebo relativním nedostatkem inzulínu, důsledkem čehož vzniká hyperglykémie. Zvýšené hladiny glukózy mohou způsobovat poškození funkce endoteliálních buněk, mohou vést k proliferaci hladkých svalových buněk a produkci extracelulární matrix. To dále vede ke ztlušťování arteriální stěny (11). Hyperglykémie také poškozuje endotel-dependentní relaxaci cév (snížená produkce NO). Z důvodu zvýšených hladin von Willenbrandova faktoru a snížených hladin aktivátoru tkáňového plazminogenu se u diabetiků vyskytuje hyperkoagulabilita krve (11). S diabetem jsou často spojeny i další rizikové faktory aterogeneze (arteriální hypertenze, dyslipidémie, obezita u DM typu 2). Chronická hyperglykémie může na cévní stěnu působit i nepřímo a to neenzymatickou glykací proteinů (kolagenu, enzymů, lipoproteinů) či vyvoláním oxidačního stresu a tvorbou volných kyslíkových radikálů (12).

Diagnostika diabetu je založena na měření glykémie v žilní krvi. Diagnóza diabetes mellitus je pozitivní v případě zjištěné glykémie nalačno  $\geq 7,0 \text{ mmol/l}$ , náhodné glykémie  $\geq 11,1 \text{ mmol/l}$  + přítomnost klasických příznaků cukrovky nebo glykémie  $\geq 11,1 \text{ mmol/l}$  v 120. minutě orálního glukózového tolerančního testu se 75g glukózy (13).

- *Obezita* – obezita je definována jako zmnožení tukové tkáně v těle a je hodnocena na základě body mass indexu (BMI). BMI je definován jako poměr hmotnosti v kg a druhé mocniny výšky v metrech. Obezita zahrnuje hodnoty BMI 30,0 a více. Rostoucí prevalence obezity ve světě s sebou nese zvyšující se riziko vzniku dalších chorob a rizikových faktorů aterosklerózy (dyslipidémie, AH, DM) (2).

- *Kouření* – cigaretový kouř obsahuje velké množství toxických látek, které se podílejí na aterosklerotickém procesu. Při rozvoji KVO se uplatňují mnohé mechanismy. Jde především o narušení vasomotorických funkcí cévního endotelu, strukturální poškození endotelu, ovlivnění spektra krevních lipidů, narušení funkce

krevních destiček, vyšší produkce volných kyslíkových radikálů, snížení koncentrace antioxidantů a další (14).

- *Fyzická inaktivita* – dle výsledků epidemiologických studií sedavý způsob života nepříznivě ovlivňuje celkový zdravotní stav a zvyšuje morbiditu i mortalitu. Fyzická aktivita působí pozitivně na jiné rizikové faktory – obezitu, snižuje hladinu LDL-cholesterolu a TAG, zvyšuje HDL. Pravidelná tělesná aktivita také stimuluje vznik kolaterál v koronárním oběhu, čímž snižuje riziko vzniku infarktu myokardu nebo náhlé smrti (8).

- *Hyperhomocysteinémie* - Hyperhomocysteinémie může být způsobena genetickými vlivy i životním stylem. Hladiny homocysteinu zvyšuje vysoký příjem methioninu, pravidelné pití kávy a kouření. Také některé léky (diuretika, metformin, fibráty) mohou zvyšovat hladinu této aminokyseliny. Vysoká hladina může být též spojena s nedostatečným příjmem kyseliny listové a vitaminu B. Homocystein může hrát roli v indukci oxidativního stresu či interagovat s koagulačním a fibrinolytickým systémem (15).

- *Infekce* – Za možný rizikový faktor v etiopatogenezi aterosklerotických onemocnění jsou považovány chronické infekce, konkrétně *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *cytomegalovirus* a HIV infekce. Jednoznačnou souvislost se ale zatím prokázat nepodařilo (16).

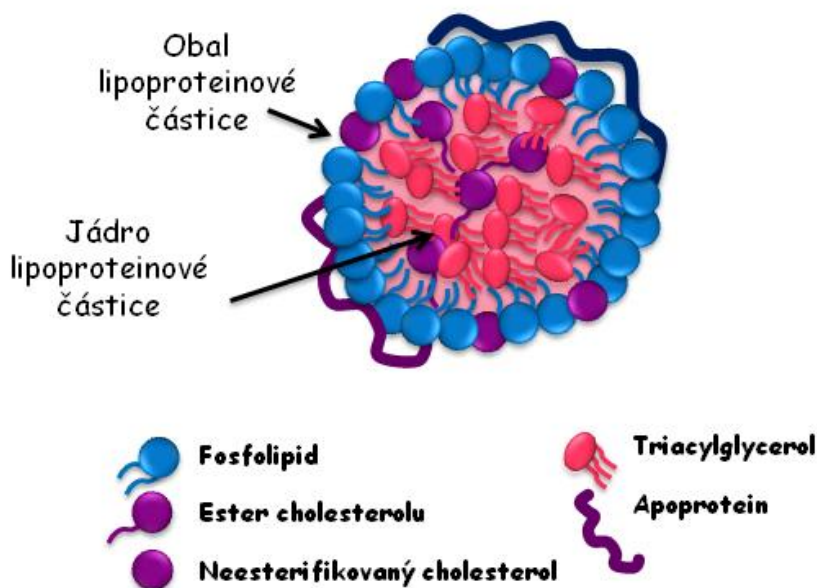
## 2.2.Lipidy a lipoproteiny

Lipidy jsou nepostradatelnou součástí organismu a mají mnoho významných a nezastupitelných funkcí. Mezi hlavní lipidy nacházející se v plazmě řadíme cholesterol, triacylglyceroly, fosfolipidy a volné mastné kyseliny, přičemž jednotlivé lipidy mají své specifické funkce.

Cholesterol je stavební součástí všech buněčných membrán, prekurzorem žlučových kyselin a steroidních hormonů. V organismu se může vyskytovat buď volný, nebo esterifikovaný. Triacylglyceroly slouží hlavně jako zdroj energie, stejně jako produkty vznikající při jejich degradaci – volné mastné kyseliny. TAG získává tělo z potravy i endogenní syntézou. Fosfolipidy jsou hlavní strukturní složkou buněčných membrán (2).

Jelikož se jedná o nepochopitelné molekuly, musí být krevním oběhem transportovány ve formě složitých komplexů zvaných lipoproteiny. Jsou to částice složené z lipidů a proteinů, přičemž proteinovou složku tvoří několik typů apolipoproteinů. Ty jsou tvořeny v játrech či v buňkách střevní sliznice a mezi nejznámější patří apoA-I, apoA-II, apoB-48, apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III a apoE. Mohou sloužit jako kofaktory enzymů v metabolismu tuků či jako ligandy pro určité typy receptorů, případně se uplatňují při výměně lipidů mezi jednotlivými lipoproteiny (2,17). Obal lipoproteinové částice tvoří fosfolipidy a neesterifikovaný cholesterol, zatímco v jádru jsou obsaženy estery cholesterolu a triacylglyceroly.

**Obr. 1: Lipoproteinová částice (18):**



Podle velikosti, funkce a složení lipidové a bílkovinné složky rozlišujeme lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL), s nízkou hustotou (LDL), střední hustotou (IDL), velmi nízkou hustotou (VLDL), chylomikrony a chylomikronové zbytky (remnants) (2).

- *Chylomikrony:* Jedná se o lipoproteiny s nejnižší hustotou. Jsou tvořeny v enterocytech a obsahují cholesterol a vysoké množství TAG z potravy. Slouží tedy k transportu lipidů z GIT do tkání, kde z nich enzym lipoproteinová lipáza (LPL) odštěpuje volné mastné kyseliny. Tyto volné mastné kyseliny (VMK) jsou využity

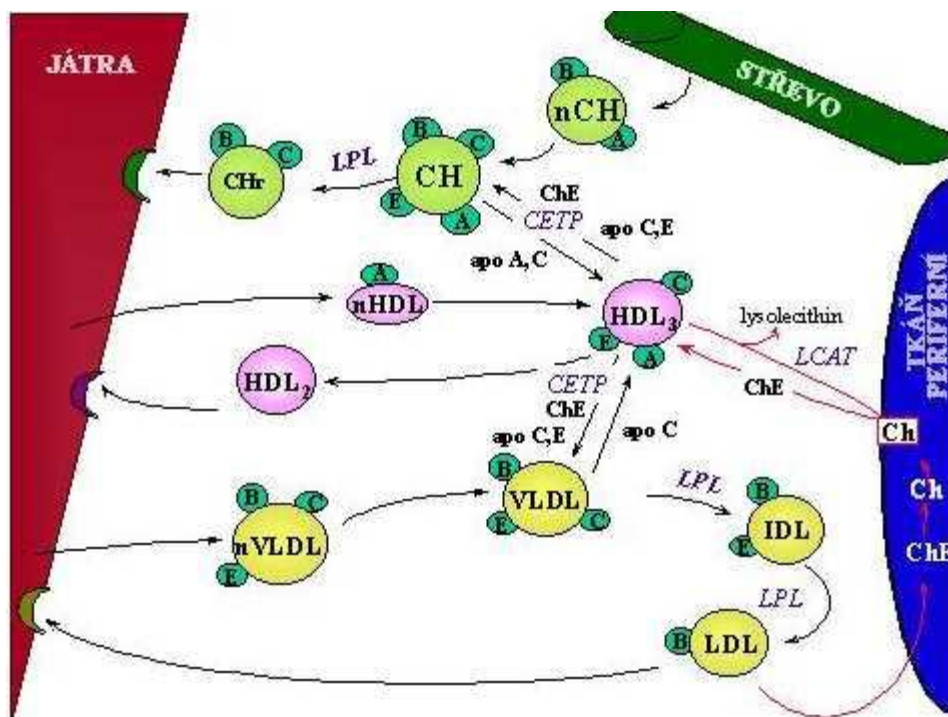
k syntéze TAG zásobního tuku či jako zdroj energie. Po odštěpení VMK a zabudování esterů cholesterolu vznikají chylomikronové zbytky, které putují do jater (2,17).

- *Lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDL):* Obsahují více cholesterolu než chylomikrony a endogenní TAG syntetizovaný v játrech. Účinkem LPL z nich v tkáních vznikají lipoproteiny střední hustoty (IDL) nebo při dalším obohacování cholesterolem až LDL (2,17).

- *Lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL):* obsahují vysoké množství cholesterolu a přenáší ho k buňkám. Tam jsou vychytávány pomocí LDL-receptoru za účasti apoB-100. LDL může být vychytáván dále i v játrech. Při nadbytku LDL-částic dochází k jejich oxidaci a následně tyto oxidované LDL jsou vychytávány scavengerovými receptory makrofágů (2,17).

- *Lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL):* Slouží pro reverzní transport cholesterolu z tkání do jater (podrobněji viz kapitola 2.3 Úloha klíčových lipoproteinů a patogenezi aterosklerózy).

**Obr. 2: Metabolismus lipoproteinů (19):**



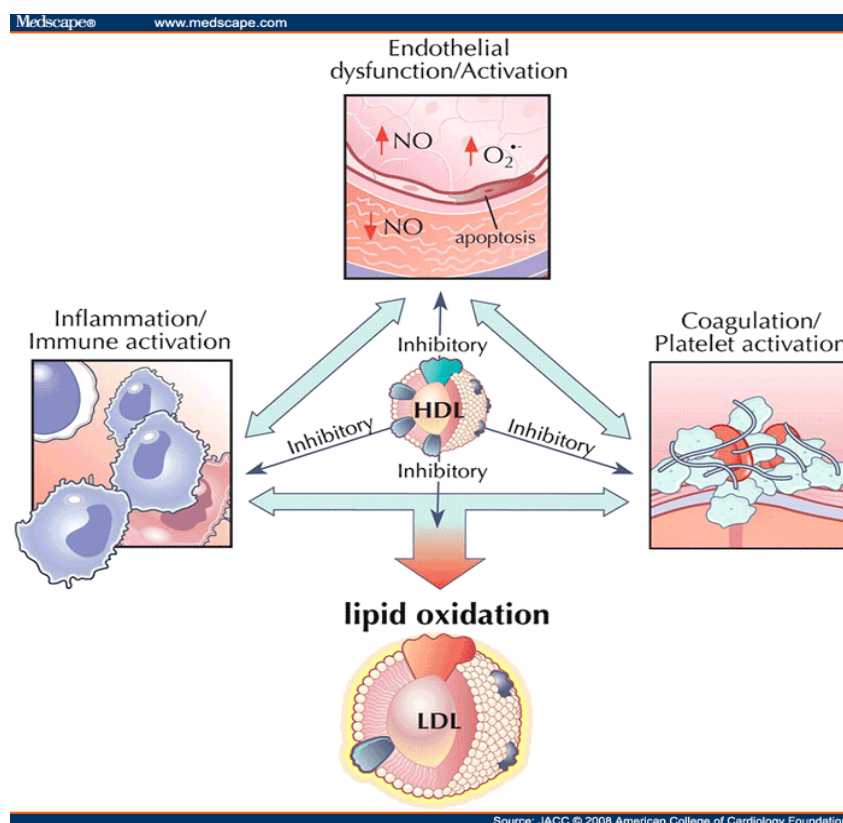
### 2.3. Úloha klíčových lipoproteinů v patogenezi aterosklerózy (20)

*Lipoproteiny nízké hustoty (LDL):* Jedná se o nejdůležitější lipoproteiny účastnící se v rozvoji aterosklerózy. Vznikají z částic VLDL po odštěpení TAG pomocí LPL a jaterní lipázy. LDL slouží k dodávání cholesterolu extrahepatálním buňkám. Jsou vychytávány z krevního oběhu buď LDL-receptory (na všech buňkách) nebo scavengerovými receptory (na buňkách monocyto-makrofágové linie). Přijatý cholesterol pak zpětnovazebně inhibuje endogenní syntézu v buňce a snižuje syntézu nových LDL-receptorů. LDL-částice se dále mohou lišit velikostí a hustotou (4). Nejvíce aterogenní vlastnosti mají tzv. malé denzní LDL-III (21).

*Chemicky modifikované lipoproteiny:* Zahrnují hlavně oxidované (oxLDL) a glykované LDL-částice. Ty jsou vychytávány scavengerovými receptory monocytů-makrofágů (20). Oxidace LDL může být vyvolaná enzymy (lipoxxygenázy, NADPH oxidáza, myeloperoxidáza, indukovatelná NO syntáza) nebo ionty přechodných kovů (železo, měď) (4).

*Lipoproteiny vysoké hustoty (HDL):* Jsou tvořeny především v játrech a slouží ke zpětnému transportu cholesterolu z tkání do jater. Proto bývají nazývány jako anti-aterogenní lipoproteiny a nízké hladiny HDL jsou rizikovým faktorem pro rozvoj kardiovaskulárních chorob. Nejdůležitějšími druhy apolipoproteinů v HDL jsou apoA-I, apoA-II a apoE. Kromě reverzního transportu cholesterolu má HDL také antioxidační účinky, čímž snižuje oxidaci LDL-částic, dále také protizánětlivé a antitrombotické účinky a různými mechanismy zlepšuje endotelovou dysfunkci (22,23).

### Obr. 3: Účinky HDL (23)



## 2.4. Cévní stěna a úloha endotelu v patogenezi aterosklerózy

Cévní stěna se skládá z 3 soustředných vrstev – tunica intima, tunica media a tunica adventitia. Tunica intima je tvořena jednou vrstvou endotelových buněk. Střední vrstva tunica media se skládá z kolagenu, hladkých svalových buněk a elastických vláken. Jednotlivé typy cév se mohou lišit v poměru těchto složek. Vnější tunica adventitia obsahuje hlavně kolagenní vazivo (24).

Endotelové buňky tvoří vnitřní stěnu cév a mají řadu nepostradatelných funkcí. Například vytvářejí nesmáčivý a netrombogenní povrch, regulují tonus hladké svaloviny cévní stěny, udržují antikoagulační a fibrinolytické vlastnosti cévního lumen, ovlivňují proliferaci buněk a zánětlivé reakce v cévní stěně (20).

Endotelové buňky jsou vysoce aktivní buňky, účastníci se mnoha procesů. Na svém povrchu exprimují molekuly typu VCAM-1, ICAM-1, selektiny E a P, což jsou molekuly umožňující interakci mezi endotelem a monocyty či jinými buňkami.



Také produkují látky s mitogenním účinkem (PDGF, FGF, TGF, M-CSF a GM-CSF), či prozánětlivé mediátory IL-1, TNF- $\alpha$  a MCP-1. Dále mohou uvolňovat různé vazodilatační (NO, EDRF) i vazokonstrikční látky (endoteliny), tkáňové aktivátory plazminogenu (tPA) a inhibitory tPA (PAI-1). Endotel funguje jako semipermeabilní membrána, která zajišťuje průnik vody, elektrolytů, lipoproteinů, proteinů či buněk (monocyty, lymfocyty). Průnik je zajištěn buď pasivně na podkladě gradientů nebo pomocí specifických vazebných molekul (selektiny, cytoadhezivní molekuly) (20).

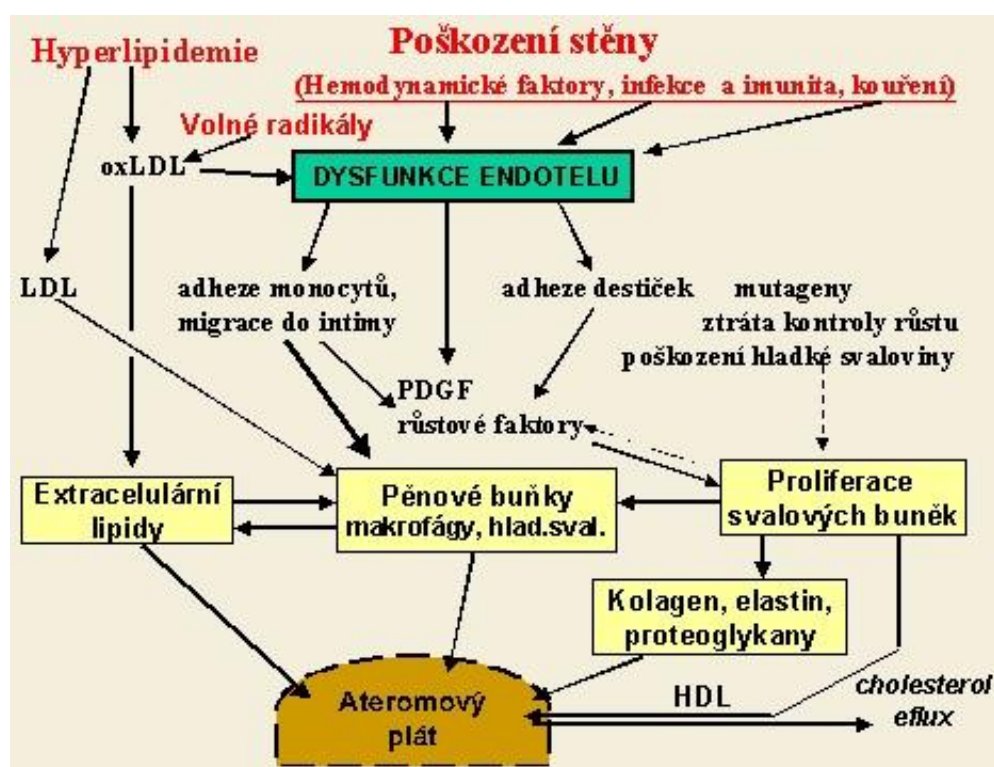
Významnou vazodilatační substancí, jejíž uvolňování je značně redukováno již v počátečních stadiích aterosklerózy, je endotelový relaxační faktor (chemicky NO). NO je produkován NO-syntázou, která existuje ve 3 izoformách. Podle místa hlavního výskytu ji dělíme na syntázu z nervových buněk (nNOS), endotelovou (eNOS) a imuncytovou syntázu (iNOS). NO-syntázy se dále dělí na indukibilní a konstitutivní, kdy konstitutivní typ zajišťuje stálou fyziologickou produkci určitého množství NO (20).

**Tab. 2: Vlastnosti a funkce endotelu (25)**

<b><i>Udržování permeability bariér</i></b>	<b><i>Modulace krevního proudu reaktivity cév</i></b> - vazokonstriktory: endothelin, enzym konvertující angiotensin - vazodilatátory: NO $\cdot$ , prostacyklin
<b><i>Syntéza antikoagulačních a antitrombotických molekul</i></b> - prostacyklin - thrombomodulin - aktivátor plasminogenu - molekuly podobné heparinu	<b><i>Regulace zánětlivých a imunitních procesů</i></b> - IL 1, IL 6, IL 8 - adhezní molekuly - histokompatibilní antigeny
<b><i>Syntéza protrombotických molekul</i></b> - von Willebrandův faktor - tkáňový faktor - inhibitor aktivátoru plasminogenu	<b><i>Regulace růstu buněk</i></b> - stimulátory růstu: PDGF, FGF, CSF - inhibitory růstu: heparin TGF $\beta$
<b><i>Tvorba extracelulární matrix</i></b> (kolagen, proteoglykany)	<b><i>Oxidace LDL</i></b>

Dysfunkce endotelu je funkční poškození endotelu charakterizované vyšší propustností pro aterogenní lipidy a makrofágy. Snížením tvorby EDRF a NO dochází k proliferaci hladkých svalových buněk a tvorbě extracelulární matrix. Vzniká nerovnováha mezi vazoaktivními mechanizmy a hemokoagulačními působky (6,26). Dysfunkce endotelu je jednak stadiem, které předchází vzniku prvotních aterosklerotických změn, a jednak se uplatňuje i v pokročilejších stádiích aterosklerózy (26).

Obr. 4: Příčiny a následky endoteliální dysfunkce (25)



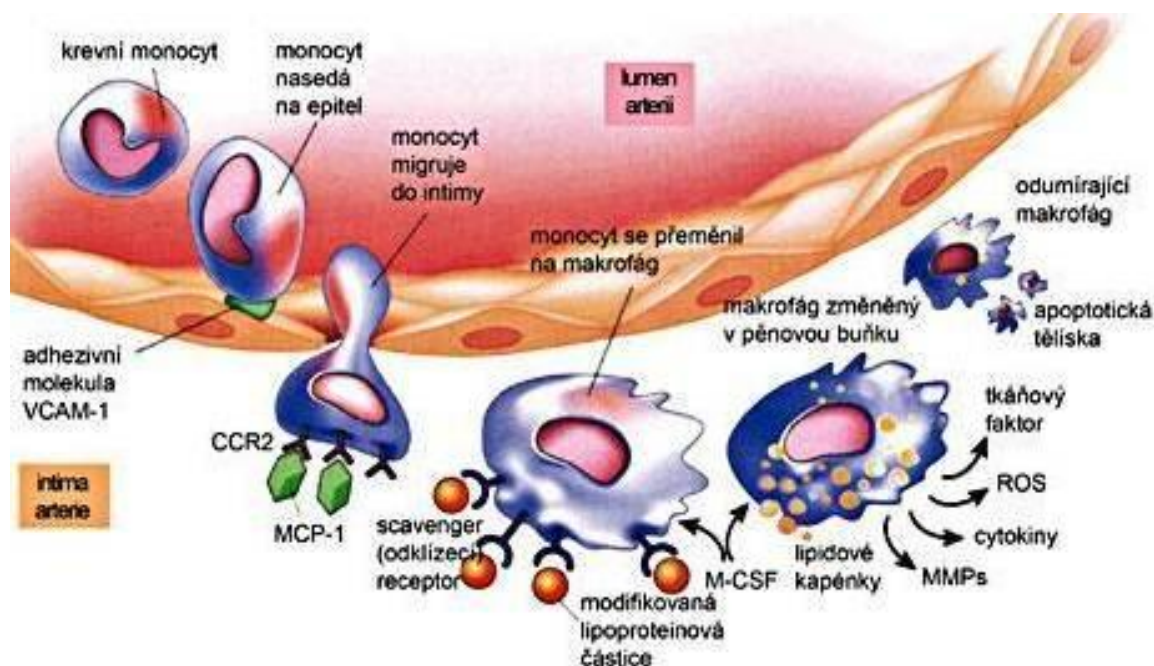
## 2.5. Úloha monocytů-makrofágů

Na základě aktivace endotelových buněk a exprese adhezních molekul na jejich povrchu monocyty prostupují do stěny arterie, kde se přeměňují na makrofágy. Ty jsou schopny produkce různých růstových faktorů (VEGF) a zánětlivých mediátorů (IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ ), které se podílejí na dalším zesílení procesu (20).

Makrofágy také produkují významné enzymy podílející se na degradaci extracelulární matrix a ztenčení fibrózní čepičky aterosklerotického plátu - matrixové metaloproteinázy (MMP). MMP patří do skupiny endopeptidáz a dnes je identifikováno 23 typů vyskytujících se u člověka (27). Většinou jsou secernovány v inaktivní formě, v aktivním místě obsahují zinečnatý kation, fungují v neutrálním pH a jsou inhibovány pomocí tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMPs) (27). Podle substrátové specifity a struktury je lze rozdělit do několika skupin – např. kolagenázy, gelatinázy, bazální membránu-degradující MMPs aj. U patologických procesů může být značně narušena rovnováha mezi MMP a TIMPs. Konkrétně v aterosklerotických plátech může tato nerovnováha způsobit destabilizaci plátu až jeho rupturu a následně klinickou manifestaci KVO (28).

Makrofágy v cévní stěně pohlcují nahromaděné částice LDL pomocí LDL-receptorů nebo scavengerových receptorů. Odlišnost těchto receptorů spočívá ve schopnosti zpětnovazebné regulace počtu receptorů v závislosti na hladině cholesterolu, která u scavengerových receptorů chybí. Proto v prostředí se zvýšenou hladinou LDL se zvyšuje pohlcování LDL-částic a makrofág se přeměňuje na pěnovou buňku. Specifickou vlastností scavengerového receptoru je také přednostní pohlcování oxLDL. Pěnové buňky se mohou rozpadat a vytvářet složku extracelulární matrix či shlukovat a vytvářet tukové proužky (2,20).

**Obr. 5: Přeměna makrofágu na pěnovou buňku (29)**



## 2.6. Úloha hladkých svalových buněk a lymfocytů

Buňky hladké svaloviny se rozdělují na 2 typy – kontraktilní a syntetický. Buňky syntetického typu během tvorby pokročilých lézí proliferují, secernují extracelulární matrix (proteoglykany, kolagen, elastin) a enzymy podílející se na syntéze a degradaci ECM během aterogeneze (30,31). Hladké svalové buňky jsou součástí fibrózní čepičky překrývající povrch aterosklerotické léze (30). Tak mohou svou proliferací stabilizovat plát proti ruptuře. Hladké svalové buňky se přesunují z medie do intimy a tím způsobují ztlustění intimy a remodelaci stěny cév (31).

V aterosklerotických plátech mohou být nacházeny i T-lymfocyty produkující řadu cytokinů (př. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , interleukiny), které ovlivňují aktivaci makrofágů a hladkých svalových buněk. Naproti tomu B-lymfocyty se v aterosklerotických plátech vyskytují pouze zřídka (20).

## 2.7. Vývojová stadia aterosklerózy

Aterosklerotické léze lze dělit mnoha způsoby. Setkat se můžeme např. s rozdělením na léze časné a pokročilé. Jako časné se označují léze typu I a II (viz dále), pokročilé pak léze typu IV, V a VI. Typ III tvoří přechodné stadium mezi lézemi časnými a pokročilými. Časné léze se mohou vyskytovat již u kojenců a dětí, přechodné léze pak v pubertálním věku.

- *Léze typu I:*

Tyto iniciační léze se mohou nacházet již v novorozeneckém věku. Nejsou viditelné pouhým okem, ale pouze mikroskopicky a jeví se jako malé žluté tečky. Jsou to izolované skupinky makrofágů obsahujících lipidové kapénky (pěnové buňky) (32).

- *Léze typu II:*

Toto stadium se nazývá stadium tukových proužků, jelikož pěnové buňky nevytváří již jen oddělené skupinky, ale souvislé pruhy. Dále se zde nacházejí hladké svalové buňky obsahující též lipidové kapénky, a určité množství T-lymfocytů. Pouze

malé množství lipidů je přítomno extracelulárně, převažují intracelulární lipidy v makrofázích a hladkých svalových buňkách (32).

- *Léze typu III:*

Označuje se také jako přechodná léze nebo preaterom. Od léze II se liší vyšším množstvím lipidů, a to i v extracelulárním prostoru. Obsahuje více volného cholesterolu, mastných kyselin, sfingomyelinu, lysolecithinu a triacylglycerolů.

Tyto 3 typy lézí neztlušťují cévní stěnu, a proto ani nezužují lumen cév a neovlivňují cévní průtok. Nelze je ani zobrazit pomocí angiografie (32).

- *Léze typu IV:*

Jedná se o první pokročilé stadium aterosklerotické léze nazývané také jako aterom. Nahromaděné extracelulární lipidy vytváří tzv. „lipidové jádro“, které již značně narušuje strukturu intimy a způsobuje excentrické zúžení cévního průsvitu. Zčásti zde vznikají i kalcifikace. V oblasti mezi lipidovým jádrem a endotelovou vrstvou se nacházejí makrofágy a hladké svalové buňky, zčásti také lymfocyty a žírné buňky. Vrstva je bohatá na proteoglykany. Narozdíl od dalších typů lézí zde nenacházíme výraznější nárůst fibrózní tkáně ani narušení povrchu léze a následné trombózy. Přesto, že zúžení lumen cévy nemusí být výrazné, klinický význam této léze může být velký. Vzhledem ke složení vrstvy mezi lipidovým jádrem a endotelem (proteoglykany, pěnové buňky, málo kolagenu a oddělené hladké svalové buňky) může být náchylná k tvorbě trhlin (léze VI) (33).

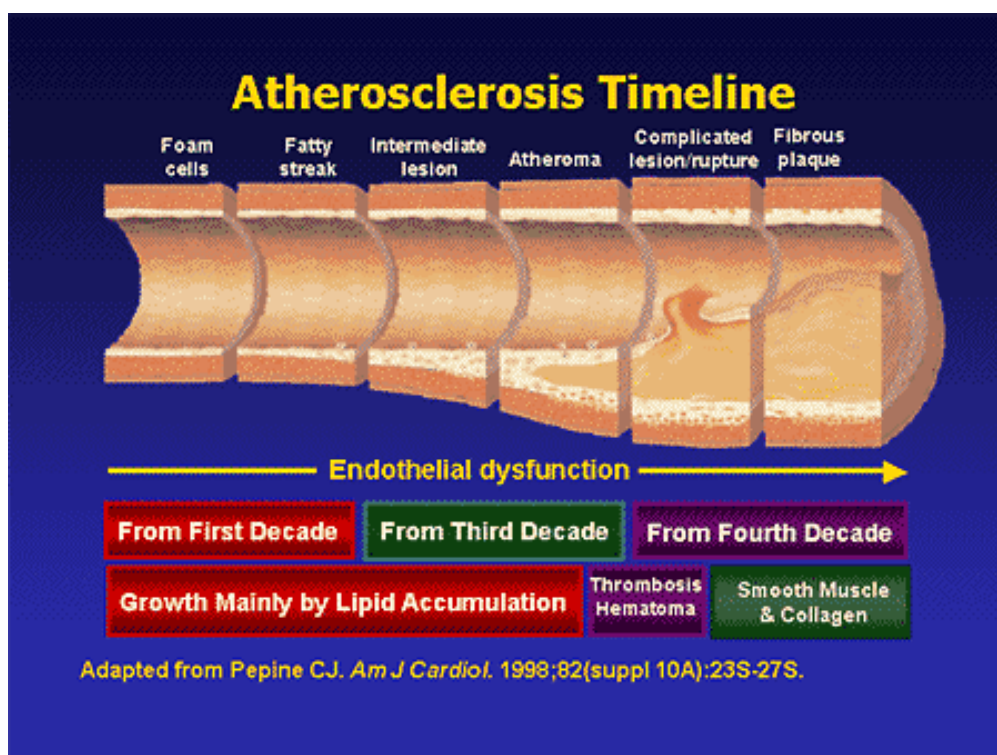
- *Léze typu V:*

Tuto lézi můžeme dále rozdělit na 3 podtypy. Podtyp *Va* je charakterizován zachovaným lipidovým jádrem a novou fibrózní tkání. Bývá také nazýván jako fibroaterom a může obsahovat i více jader navzájem oddělených fibrózní tkání. Typ *Vb* má kalcifikované jádro a u typu *Vc* lipidové jádro chybí. Nová tkáň je bohatá na kolagen a hladké svalové buňky. Klinická významnost spočívá v možnosti vzniku trhlin, hematomů a trombů (33).

- *Léze typu VI:*

Léze typu *VI* je vlastně typ *IV* nebo *V* s vyjádřenými komplikacemi (trhlina, hematom, trombus). Příčinou ruptury povrchu mohou být zánětlivé buňky uvnitř léze, proteolytické enzymy makrofágů, koronární spasmy a jiné. Oblasti léze s vyšším výskytem pěnových buněk jsou náchylnější k ruptuře. Hematomy mohou vznikat jako hemoragie uvnitř lézí během vytváření nových cév. Spolu s tromby pak mohou být inkorporovány do aterosklerotické léze a zvětšovat tak postupně okluzi dané cévy (33).

**Obr. 6: Vývojová stadia aterosklerózy (34)**

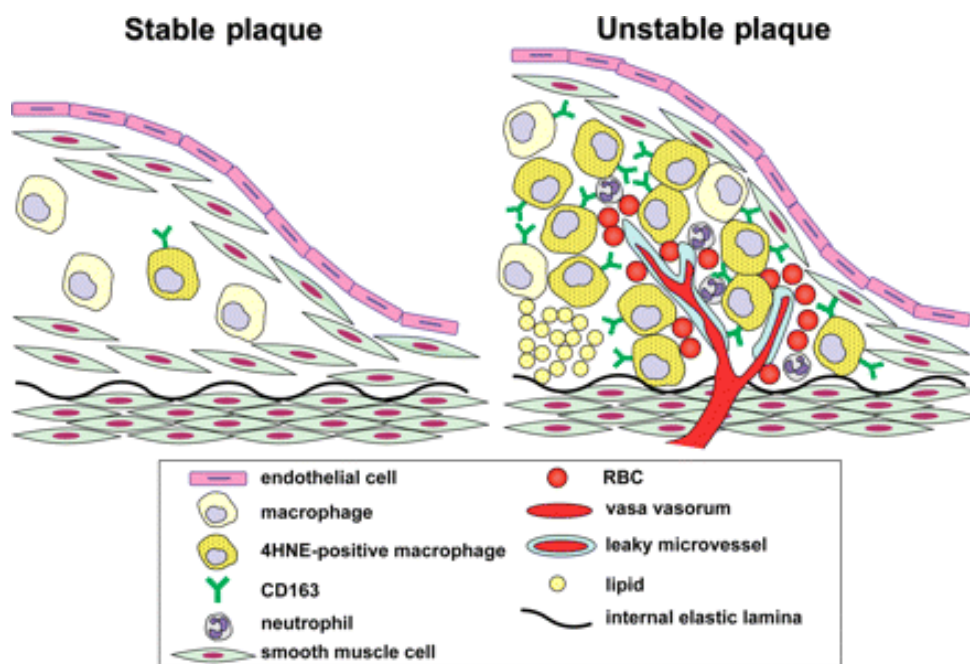


## 2.8. Typy aterosklerotických plátů

Podle složení aterosklerotického plátu rozlišujeme pláty stabilní a nestabilní (vulnerabilní). Největší význam má velikost a složení lipidového jádra, množství kolagenu ve fibrózní čepičce a přítomnost zánětlivých změn uvnitř fibrózního krytu plátu. U nestabilních plátů se setkáváme s vysokým množstvím extracelulárních lipidů v lipidovém jádře a tenkou fibrózní čepičkou s nízkým obsahem hladkých svalových buněk a kolagenu. Je zde zvýšené množství makrofágů podílejících se na destabilizaci plátů, zejména produkcí proteolytických enzymů (matrixových metaloproteináz), které degradují kolagen, elastin a proteoglykany fibrózního krytu. Ve vysokém počtu se vyskytují na okrajích ateromových plátů, které jsou nejcitlivější k ruptuře (20,35).

Při ruptuře dochází k hemoragii do plátu a vzniku trombózy, která je způsobena aktivací destiček a koagulačních faktorů (35). Ruptura může být i asymptomatická. Pokud nedojde k významnému snížení průtoku krve cévou, dochází pouze k další progresi aterosklerotického plátu. V opačném případě při vzniku okluzivního trombu dojde ke klinické manifestaci aterosklerózy ve formě ICHS, ICHDK či CMP (20).

**Obr. 7: Stabilní a nestabilní aterosklerotický plát (36)**





### **3. SMAD PROTEINY A JEJICH VÝZNAM V PROCESU ATEROGENEZE**

#### **3.1. Transformující růstový faktor**

Nadrodina transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) zahrnuje větší množství polypeptidů, např. TGF- $\beta$ , bone morphogenic protein (BMP) aj. Konkrétně TGF- $\beta$  byl identifikován u savců ve třech izoformách - TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 a TGF- $\beta$ 3. TGF- $\beta$ 1 je multifunkční cytokin, který má významné protizánětlivé a antiproliferativní účinky na buňky aterosklerotických lézí. Proto je TGF-  $\beta$ 1 přisuzována protektivní role v procesu ateroskleroze (37). Svědčí pro to i fakt, že u pacientů s pokročilou aterosklerózou jsou hladiny TGF- $\beta$ 1 výrazně sníženy oproti pacientům bez výrazných aterosklerotických změn (38).

Syntéza TGF- $\beta$ 1 je složitý proces, při kterém je TGF- $\beta$ 1 produkován v latentní formě vyžadující aktivaci. Té se účastní některé proteázy, zejména thrombospondin-1 (TSP-1) či integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6 (39). Teprve poté se může vázat na své specifické receptory.

Jsou rozlišovány 2 typy TGF- $\beta$  receptorů (TGF- $\beta$ RI a TGF- $\beta$ RII), oba mají serin/threonin kinázovou aktivitu. TGF- $\beta$ 1 se váže nejprve na TGF- $\beta$ RII, který dále dimerizuje a fosforyluje TGF- $\beta$ RI. Následnými změnami konformace tohoto receptoru dochází k fosforylaci a aktivaci Smad proteinů, které slouží k převedení signálu z receptoru do jádra (37). Vazba těchto Smad na TGF- $\beta$ RI je usnadňována pomocí proteinu nazývaného SARA.

TGF- $\beta$ 1 se může vázat také na betaglykan a endoglin (nazývané také TGF- $\beta$ RIII). Jsou to transmembránové proteiny, které narozdíl od TGF- $\beta$ RI a TGF- $\beta$ RII nemají kinázovou aktivitu (37). Funkcí betaglykanu je usnadnění vazby TGF- $\beta$ 2 na TGF- $\beta$ RII, který má k tomuto receptoru jinak jen malou afinitu (40). Endoglin je součástí receptorového komplexu TGF- $\beta$  a váže hlavně TGF- $\beta$ 1 a TGF- $\beta$ 3. Bez spojení s TGF- $\beta$ RII není schopen vázat TGF- $\beta$  (40).

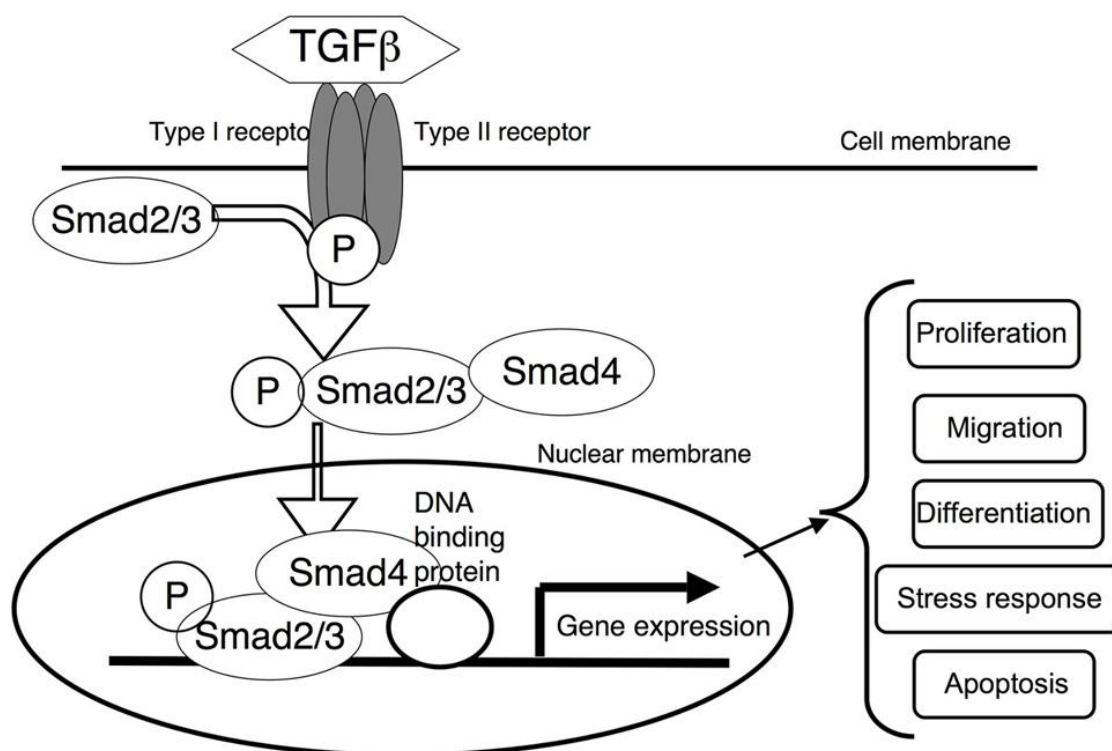
TGF- $\beta$ RI bývá také nazýván „activin receptor-like“ kináza (ALK) a může se vyskytovat ve více formách. V cévách jsou nejčastější ALK1 a více rozšířená ALK5. Aktivace ALK1 nebo ALK5 vede k různým odpovědím. Tak např. aktivací ALK1 dochází k nitrobuněčné transdukci signálu pomocí Smad1, Smad5 a Smad8, což



v důsledku vede k proliferaci a migraci endoteliálních buněk. Naopak inhibice proliferace a migrace těchto buněk je způsobena aktivací ALK5, která vyvolává fosforylaci Smad2 a Smad3 (37,40,41).

Rozdílná exprese TGF- $\beta$ RI a TGF- $\beta$ RII může být klíčová v rozvoji aterosklerotických lézí. Studie, které provedl McCaffrey a kol.(42), poukazují na vyšší poměr TGF- $\beta$ RI k TGF- $\beta$ RII v cévách postižených aterosklerotickým procesem.

**Obr. 8: Převod signálu TGF- $\beta$ 1/Smad (43)**



### 3.2.Smad proteiny

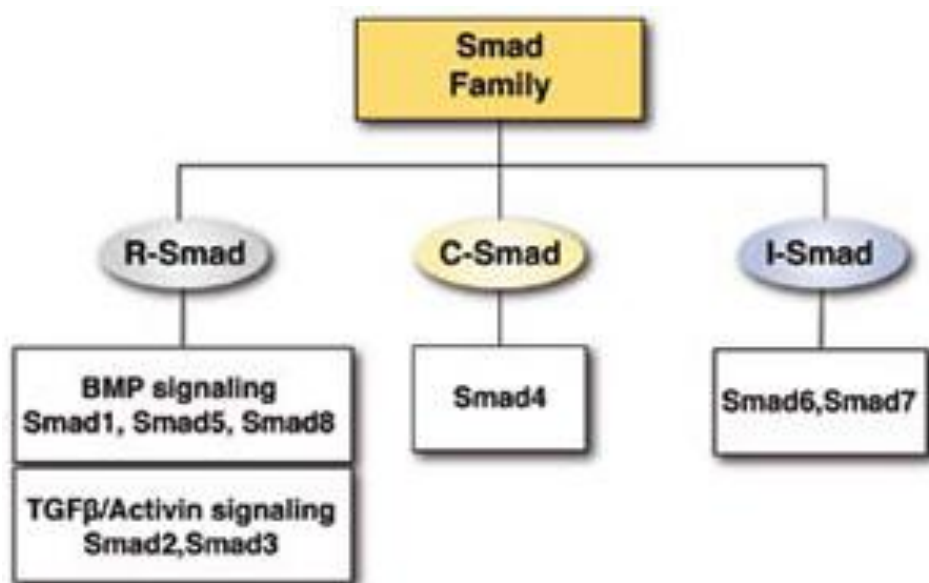
Smad proteiny jsou speciální proteiny zprostředkující přenos signálu z TGF- $\beta$  receptorů do jádra. Poprvé byly identifikovány u *Drosophily* (Mad) a *Caenorhabditis elegans* (Sma).

Podle funkce a struktury se rozlišují 3 třídy Smad proteinů a to receptory-regulované Smad (R-Smad), „common mediator“ Smad (Co-Smad) a inhibiční Smad (I-Smad). K R-Smad řadíme např. Smad-2 a Smad-3, které jsou fosforylovány pomocí receptoru TGF- $\beta$ , a dále Smad-1, Smad-5 a Smad-8, které jsou fosforylovány jako

odpověď na navázání BMP na receptor. Tyto R-Smad mohou interagovat s Co-Smad (Smad-4) a tento komplex pak proniká do jádra (37,44). Inhibiční Smad (Smad-6 a -7) zastavují přenos signálu do jádra tím, že zabraňují fosforylaci R-Smad nebo tvoří komplex s R-Smad a Co-Smad (44).

Pro strukturu Smad jsou charakteristické 2 „Mad-Homology“ domény MH1 a MH2 v N- a C- terminální oblasti. Smad-2 a Smad-3 jsou fosforylovány na C-konci. MH1 doména slouží k přímé vazbě na DNA, MH2 doména pak zprostředkovává interakce proteinů (37).

**Obr. 9: Rozdělení Smad proteinů (45)**



### 3.2.1. Smad2

Funkce jednotlivých R-Smad se sledují pomocí cílené inaktivace daných genů u myši. Zatímco Smad-2 deficitní myši umírají již během časně březosti, Smad3 deficitní myši se rodí živé, nicméně mohou se u nich vyskytovat poruchy skeletu, osteoporóza, rakovina tlustého střeva či poruchy slizniční imunity a poruchy odpovědi T-buněk na TGF- $\beta$ 1 (46).

I přes značnou strukturní podobnost má Smad2 nižší schopnost vázat se na DNA ve srovnání se Smad3, což je způsobeno odlišností v MH1 doméně (37). Smad2 a

Smad3 mohou ovlivňovat jak buňky imunitního systému, tak neimunitní buňky (endoteliální či hladké svalové buňky) (37).

### **Funkce Smad2:**

- *Účinek na hladké svalové buňky:* TGF- $\beta$  působí i na hladké svalové buňky, jejichž aktivace je klíčová v procesu tvorby aterosklerotických plátů. V hladkých svalových buňkách se účinek Smad2 projevuje potlačením proliferace těchto buněk (37). Tím se liší od Smad3, který se uplatňuje více v potlačení exprese IL-6 a iNOS hladkosvalovými buňkami, což má též protektivní vliv na tvorbu aterosklerotických plátů (47).

- *Účinek na endotelové buňky:* TGF- $\beta$ 1 prostřednictvím Smad2 tlumí v endotelových buňkách expresi adhezních molekul E-selektinu, která je zprostředkována IL-1 $\beta$ . Bylo pozorováno též zvýšení exprese eNOS. Tyto účinky se podílejí na antiaterogenním působení TGF- $\beta$ 1.

- *Účinek na T-buňky:* Vzhledem k přítomnosti fosforylované formy Smad2 i v T-buňkách se předpokládá působení tohoto Smad proteinu i na T-lymfocyty, podrobně však ještě popsáno nebylo (37). Na rozdíl od něj se soudí na ovlivnění T-buněk pomocí Smad3, který hraje roli v regulaci aktivace, růstu a diferenciaci těchto buněk (37).

## 4. STATINY

Statiny patří mezi hypolipidemika, což je skupina látek používaných ke snižování hladin cholesterolu nebo triacylglycerolů. Statiny konkrétně snižují převážně hladiny cholesterolu, a proto mohou být také nazývány jako hypocholesterolemika. Považují se za nejúčinnější léky z této farmakologické skupiny (21). Konkrétní zástupci statinů se mohou lišit účinností a tzv. nelipidovým působením – antiagregační účinky, inhibice proliferace hladkosvalových buněk ve stěně tepen, stimulace tvorby NO-syntetázy aj. (2,21). Statiny jsou jediná hypolipidemika, která ovlivňují mortalitu a morbiditu na kardiovaskulární onemocnění (48).

První statin byl izolován z produktu plísně *Penicillium citricum* na počátku 70. let minulého století v Japonsku. Jednalo se o mevastatin, který se stal prekurzorem pro vůbec první statin využitý v praxi - lovastatin. Ostatní dnes používané statiny jsou syntetického původu (49).

Hlavní indikace statinů je hypercholesterolemie a smíšená dyslipidémie.

**Tab. 3: Správné indikace statinů (50):**

<b>Správné indikace statinů:</b>	
<b>Statiny jsou indikovány:</b>	<b>Statiny nejsou indikovány:</b>
U nemocných v primární prevenci s rizikem kardiovaskulární příhody vyšším než 20% v průběhu 10 let	U nemocných s nízkým kardiovaskulárním rizikem
U nemocných v sekundární prevenci	U nemocných s izolovanou elevací triacylglyceridů
U diabetiků	

### 4.1. Mechanismus účinku

Statiny kompetitivně inhibují funkci HMG-CoA reductasy (hydroxymethylglutaryl-koenzymA reductasy), což je klíčový enzym limitující syntézu cholesterolu. Umožňuje přeměnu HMG-CoA na kyselinu mevalonovou, která je

prekurzorem cholesterolu. HMG-CoA reduktasa se vyskytuje hlavně v hladkém endoplazmatickém retikulu jaterních buněk. Inhibice syntézy cholesterolu vyvolá zvýšení exprese LDL-receptorů v buňkách, což vede k rychlejšímu vychytávání LDL-cholesterolu z krevního oběhu. Urychlením eliminace LDL-částic z oběhu a zároveň snížením endogenní syntézy cholesterolu lze dosáhnout pokles hladin cholesterolu v závislosti na dávce až o 25-60%. Zároveň můžeme pozorovat mírný vzestup HDL (5-10%) a pokles triacylglycerolů až o 10-30% (2,21,51).

## **4.2.Farmakokinetika**

Prvními statiny uvedenými na trh byly lovastatin a simvastatin. Jako jediní zástupci jsou podávání ve formě proléčiva a vlastní účinná látka je tvořena až v játrech. Všechny statiny jsou intenzivně vychytávány z krve v játrech již při prvním průchodu. Nejvyšší koncentrace v plazmě je dosažena za 2-4 hodiny po perorálním podání. Převážná většina je vylučována ve stolici, jen asi 10-20% je vyloučeno močí. Rosuvastatin a atorvastatin mají prodloužený biologický poločas, přesto lze všechny zástupce podat v jedné denní dávce nezávisle na podání jídla, nejlépe na noc, kdy je endogenní syntéza cholesterolu nejvyšší (2,21).

## **4.3.Lékové interakce**

Významné lékové interakce jsou pozorovány u kombinace statinů s léčivými inhibujícími nebo indukujícími cytochrom P450.

Simvastatin, lovastatin a atorvastatin jsou metabolizovány izoenzymem CYP3A4. Z toho vyplývají interakce s látkami, které ovlivňují aktivitu tohoto izoenzymu. Inhibitory CYP3A4 jsou například makrolidová antibiotika, verapamil, diltiazem, azolová antimykotika, grapefruitová šťáva. Tyto látky mohou způsobit až dvacetinásobné zvýšení plazmatické koncentrace zmíněných statinů, z čehož vyplývá podstatné zvýšení rizika vážných nežádoucích účinků.

Hydrofilní statiny fluvastatin a pravastatin interakce na úrovni CYP3A4 nevykazují. Fluvastatin je metabolizován CYP2C9, rosuvastatin není cytochromovým systémem metabolizován téměř vůbec. Proto se u něj tyto farmakokinetické interakce nevyskytují (2,21).

#### **4.4. Nežádoucí účinky**

- Hepatopatie: asi u 2 % pacientů může dojít k asymptomatickému zvýšení jaterních transamináz. Tento nežádoucí účinek je závislý na dávce statinu a bývá reverzibilní po vysazení léku. Nicméně je velmi důležité provádět u pacientů léčených statiny častější kontroly jaterních testů, zpravidla jednou za půl roku (50).
- Postižení svalové tkáně: Jedná se o nejzávažnější nežádoucí účinek statinů. Může se projevovat jako svalová slabost, bolest, ztuhlost či křeče. Někdy se může rozvinout myositida, která může vést až k rhabdomyolýze a selhání ledvin. Rhabdomyolýza je velmi vzácným nežádoucím účinkem, objevujícím se zpravidla při nevhodných kombinacích statinů s jinými léčivy (inhibitory CYP3A4). Diagnostika se provádí vyšetřením enzymu kreatinkinázy a myoglobinu v séru (2,21). V souvislosti se značně zvýšeným rizikem rhabdomyolýzy byl před několika lety stažen z trhu cerivastatin.
- Ostatní nežádoucí účinky: V souvislosti s terapií se mohou vyskytovat bolesti hlavy, dyspepsie, svědění a exantém (2).

#### **4.5. Pleiotropní účinky statinů**

Jako pleiotropní účinky se označují ty, které jsou nezávislé na sérové hladině cholesterolu. Tyto účinky jsou intenzivně zkoumány, jelikož celkový výsledek léčby statiny není pravděpodobně založen pouze na snížení hladin cholesterolu, nýbrž i na těchto „nelipidových“ účincích statinů (52).

- *Vliv statinů na funkci endotelu (53):*

Hyperlipoproteinemie způsobuje endoteliální dysfunkci. Ta může vést ke zvýšené tvorbě superoxidového aniontu, k redukci syntézy NO endoteliálními buňkami či ke zvýšené expresi adhezních molekul, které se pak podílejí na adhezi a prostupu monocytů do stěny cév. Dále může být narušena produkce von Willebrandova faktoru, PAI-1, tPA a prostacyklinu, čímž se zvýší koagulabilita séra. Jelikož statiny snižují hladinu lipidů v séru, zlepšuje se i funkce endotelu.

- *Vliv statinů na stabilitu aterosklerotického plátu (54):*

Stabilita aterosklerotického plátu je určována obsahem lipidů, množstvím aktivovaných makrofágů a obsahem kolagenu ve fibrózním krytu. Makrofágy produkují enzymy metaloproteinázy (MMP), jejichž aktivitou dochází k oslabení fibrózního krytu plátu a následné ruptuře. Také uvolňují tkáňový faktor zvyšující trombogenní potenciál plátu. Statiny snižují syntézu metaloproteináz a inhibují expresi tkáňového faktoru. Z experimentů na lidských karotidách však vyplývá, že stabilizace plátu je zprostředkována účinkem statinů na snížení hladin lipidů, snížení lipidové oxidace, zánětu, některých metaloproteináz a buněčné smrti. Naopak mohou zvyšovat hladinu tkáňového inhibitoru metaloproteinázy-1 a obsah kolagenu v plátu (54-56).

- *Vliv statinů na destičkové funkce:*

Důsledkem hypercholesterolemie je zvýšená destičková aktivita. Snížení trombogenicity při léčbě simvastatinem a pravastatinem bylo prokázáno Rauchem a kol. (57), přičemž rozdíly mezi oběma statiny nebyly pozorovány. Pravděpodobně je to způsobeno snížením produkce thromboxanu A<sub>2</sub> a modifikací membrány destiček (58).

- *Vliv statinů na proliferaci hladkých svalových buněk:*

Proliferace hladkých svalových buněk ve stěně cév se uplatňuje v patogenezi aterosklerózy. Bellosta a kol. (59) provedli studii, kde poukázali na skutečnost, že fluvastatin, simvastatin, lovastatin a cerivastatin snižují in vitro migraci a proliferaci hladkých svalových buněk. Totéž ale nebylo pozorováno u hydrofilnějšího pravastatinu (54,59). Pravděpodobným mechanismem je snížená isoprenylace signálních proteinů Ras a Rho indukovaná PDGF (54,58).

- *Vliv statinů na zánětlivé reakce:*

V aterosklerotických plátech je zvýšený počet monocytů nebo makrofágů a T-lymfocytů, které produkují prozánětlivé cytokiny. Předpokládá se, že působením statinů dochází ke snížení exprese adhezivních molekul ICAM-1, které vychytávají cirkulující monocyty. Statiny dále snižují plazmatické hladiny CRP (C-reaktivní protein), což je protein tvořený játry jako odpověď na zánětlivou reakci (58).

Možné negativní pleiotropní účinky: V souvislosti s inhibicí HMG-CoA reduktázy dochází k inhibici syntézy nejen cholesterolu, ale i jiných významných látek jako je např. geranylpyrofosfát, což může mít za následek sníženou syntézu koenzymu Q10. Koenzym Q10 má významnou úlohu v metabolismu myokardu, jeho nedostatek je spojen s vyšším rizikem poškození myokardiálních buněk. Proto je doporučováno u pacientů dlouhodobě léčených statiny koenzym Q10 substituovat (60).



**Obr. 10: Pleiotropní účinky statinů (52):**

#### **Na úrovni endotelu**

- normalizace endoteliální dysfunkce
- snížení adheze destiček a leukocytů na cévní endotel
- stimulace NO-syntetázy a tvorby NO a prostacyklinů
- inhibice syntézy prostaglandinů, hlavně tromboxanů
- zvýšení aktivátoru plazminogenu
- snížení inhibitoru-1 plazminogenového aktivátoru
- zvýšení PPAR (peroxysome proliferator-activated receptor)
- snížení endotelinu-1

#### **Na úrovni cévní stěny**

- stabilizace aterosklerotického plátu
- snížení proliferace hladkých svalových buněk
- snížení adheze trombocytů a leukocytů
- snížení migrace monocytů do intimy

#### **Na úrovni krevní plazmy**

- zlepšení viskozity
- ovlivnění trombolyticko-fibrinolytické rovnováhy
- ovlivnění hemostatických faktorů
- snížení oxidace LDL cholesterolu
- protizánětlivé působení
- stabilizace makrofágů
- snížení proliferace lymfocytů
- snížení hs CRP (high sensitive CRP) a CRP
- snížení tvorby cytokinů
- snížení metaloproteáz

#### **Na úrovni destiček**

- snížení agregace a adheze
- zlepšení permeability buněčné membrány
- snížení syntézy tromboxanu

## 5. MODEL ATEROSKLERÓZY

Počátky výzkumu aterosklerózy se objevily již v roce 1908, když Ignatowski (61) zkoumal ztlustění intimy u králíků krmených dietou bohatou na živočišné proteiny (maso, mléko, vejce).

Ke studiu aterosklerózy jsou používány různé druhy zvířat, ne všechny ale mají dostatek výhodných vlastností. Tak například potkani a psi nejsou vhodnými modely pro studium aterosklerózy, jelikož nevytváří léze spontánně a k tvorbě lézí je potřeba složitá modifikace jejich stravy. Naopak králíci jsou velmi citliví na podávání cholesterolu a vytvářejí léze v poměrně krátkém čase (62). Léze se ovšem liší od lidských obsahem makrofágů a tuku, také plazmatické hladiny cholesterolu jsou mimořádně vysoké. Vhodnějšími modely pro lidskou aterosklerózu mohou být prasata a opice. Opice ale nejsou využívány kvůli riziku vyhynutí. Prasata vytváří aterosklerotické léze velmi podobné těm lidským, problémem je ale jejich chov a cena (63). Nejvíce osvědčeným modelem aterosklerózy jsou myši.

### 5.1. Myší modely aterosklerózy:

V biomedicíně výzkumu jsou myší modely využívány velice často. Jednou z výhod je dobrá znalost genetické informace, dále jsou myší modely často využívány pro genetické manipulace (vložení nových genů, narušení specifických alel) či testování nových účinných látek (64).

Obecně jsou myši velmi odolné k tvorbě aterosklerózy. Je to důsledek vysokých hladin antiaterogenního HDL a nízkých hladin proaterogenního LDL a VLDL. Proto musí být myší modely upravovány narušením lipoproteinového metabolismu a to buď genetickou manipulací, nebo úpravou stravy (65). Nejčastěji používanými modely jsou Apo-E deficitní myš (ApoE<sup>-/-</sup> myš) a LDL-receptor-deficitní myš (LDLR<sup>-/-</sup>).

Jediný kmen schopný vytvářet aterosklerózu je kmen C57BL/6. Experimentální ateroskleróza u nich byla poprvé navozena v 60. letech 20. století podáváním speciálně upravené diety obsahující 30% tuku, 5% cholesterolu a 2% cholesterové kyseliny (63).

Později byla využívána dieta se zdánlivě výhodnějšími vlastnostmi, nazývaná jako „Paigen diet“, obsahující 15% tuku, 1,25% cholesterolu a 0,5% kyseliny cholové. Zde byly ale také nalezeny některé nevýhodné vlastnosti, jako je příliš vysoký obsah cholesterolu a přítomnost kyseliny cholové, navíc má tato dieta sama o sobě prozánětlivé vlastnosti (66).

Při výzkumu aterosklerózy je nutno brát v úvahu rozdíly mezi myšími modely a lidmi jako je průměrná délka života, rozdíl v tělesné hmotnosti či rozdílnost v lipidovém spektru. Na rozdíl od lidí převažuje u myší HDL cholesterol, který má v procesu aterogeneze protektivní vlastnosti. Proto u myší krmených normální nízkotučnou stravou nepozorujeme vznik aterosklerózy. Je u nich také možno kontrolovat vliv životního prostředí a podávané stravy na rozdíl od dlouhodobých studií u lidí. Výhodným jevem je rozvoj aterosklerózy v relativně krátkém čase u velkého počtu jedinců. Za nevýhodu u myších modelů je považována jejich malá velikost, která znesnadňuje provedení některých chirurgických zásahů a zobrazování změn in vivo (63).

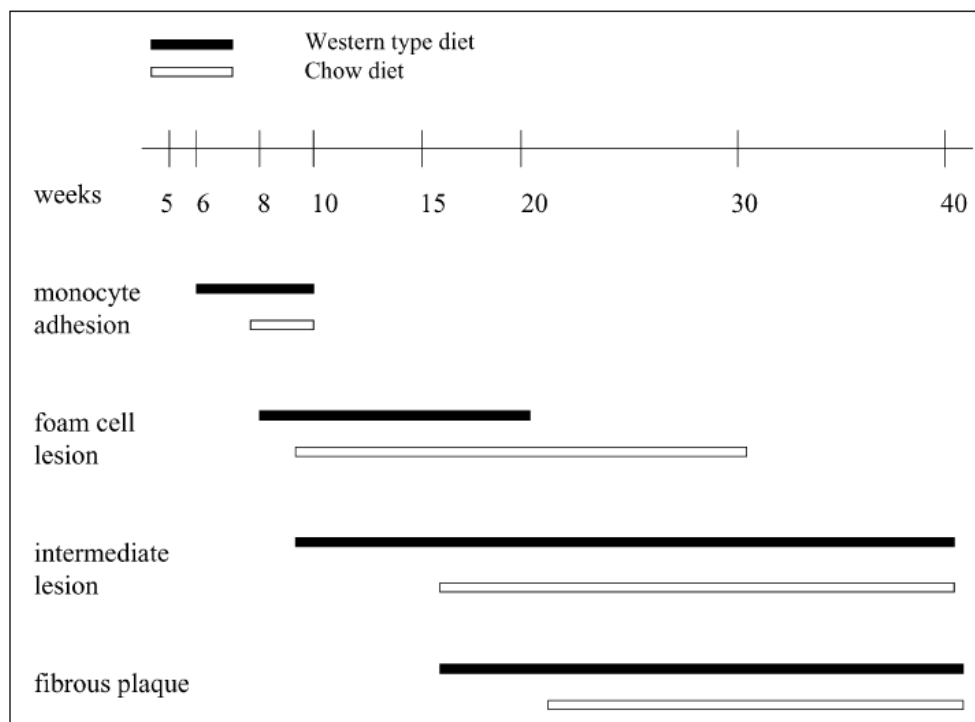
#### **5.1.1. Apolipoprotein E-deficitní myši**

Apolipoprotein E (apoE) je glykoprotein syntetizovaný v játrech, mozku a jiných tkáních u člověka i myši a má významné antiaterogenní vlastnosti (63,65). Je součástí plazmatických lipoproteinů, kde slouží jako ligand pro ApoB a ApoE(LDL) receptor a pro receptor pro chylomikronové zbytky. Tím zprostředkovává specifické vychytávání částic obsahujících apoE v játrech (67). Existují důkazy, že apoE má i další antiaterogenní vlastnosti kromě regulace vychytávání lipoproteinů (68,69). ApoE má pravděpodobně i antioxidační, antiproliferativní (hladké svalové buňky, lymfocyty), protizánětlivé, proti-destičkové a NO-generující vlastnosti (68-71) a může též modulovat imunitní odpověď (72).

Apo-E deficitní myši byly vytvořeny inaktivací genu pro ApoE v roce 1992 (63) a patří mezi nejlépe prozkoumané modely. Tyto myši vykazují zvýšený celkový cholesterol v plasmě a spontánní tvorbu aterosklerotických lézí, dokonce i při standardní dietě obsahující nízký podíl tuku a žádný cholesterol (65). Léze jsou podobné lidským a jejich rozvoj lze urychlit podáním vysokotučné diety s velkým

obsahem cholesterolu (73). Podáním upravené stravy (tzv. „western-type“), která obsahuje 21% tuku, 0,15% cholesterolu a chybí v ní kyselina cholová, bylo dosaženo u těchto geneticky modifikovaných myší až trojnásobného zvýšení plazmatického cholesterolu a zvětšení aterosklerotických lézí, které se vyvinuly rychleji než při normální stravě (63).

**Obr. 11: Porovnání tvorby lézí u myší s normální a „western-type“ dietou (63)**



### 5.1.2. LDL-receptor deficitní myši

LDL-receptor deficitní myši (LDLR<sup>-/-</sup>) byly poprvé použity v roce 1993 (74). Tento model je velmi citlivý na složení stravy. Při běžné dietě mají jen lehce zvýšené plazmatické hladiny cholesterolu a vyvíjejí aterosklerózu pouze velmi pomalu. Nicméně při podávání vysokotučné stravy lze dosáhnout rychlé tvorby velkých aterosklerotických lézí (63,75). Aterosklerotické léze jsou tvořeny převážně makrofágy bohatými na cholesterol s minimálním množstvím ostatních složek (64).

## **6. CÍL PRÁCE**

Cílem této rigorózní práce bylo popsat vliv atorvastatinu na expresi člena TGF- $\beta$ /endoglin signalizační kaskády, konkrétně fosforylované formy Smad2. K tomu byly využity imunohistochemické metody. Dále jsme sledovali vliv atorvastatinu na spektrum lipidů a velikost aterosklerotických plátů.

## 7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 7.1. Zvířata a použitá dieta

V experimentu byly použity 2 měsíce staré samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru (n=16) zakoupené v Jackson Laboratories, USA. Zvířata byla náhodně rozdělena do 2 skupin.

Všechny myši byly krmeny dvěma různými experimentálními dietami po dobu dvou měsíců s vodou k dispozici *ad libitum*. Jedna skupina zvířat (kontrolní, CHOW) (n=8) byla krmena standardní dietou. Druhá skupina (n=8) dostávala též standardní dietu, ke které byl přidán atorvastatin (ATV) v dávce 50 mg/kg/den.

Každé zvíře bylo chováno v samostatné kleci a dostávalo 4g diety denně (ve speciálně upravených granulích). Každý den byla monitorována spotřeba stravy. Mezi zvířaty nebyl pozorován rozdíl ve spotřebě stravy.

Na konci experimentu byla všechna zvířata přes noc vyhladověna a usmrcena éterem. Byla jim odebrána aorta spolu s horní polovinou srdce a ponořena do OCT media (Leica, Prague, Czech Republic). Následně byly vzorky zmrazeny v tekutém dusíku a před histochemickým a imunohistochemickým barvením uskladněny při minus 80°C.

### 7.2. Biochemická analýza

Biochemická analýza vzorků krve byla provedena na gerontologické a metabolické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol při 510 nm, triglyceridy při 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

Biochemická analýza byla vypracována na Gerontometabolické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové.

### **7.3.Histologické barvení olejovou červení**

Barvení olejovou červení se používá k detekci lipidů ve tkáních. Zde byla tato metodika použita pro stanovení množství lipidů v aterosklerotických lézích.

*Postup barvení olejovou červení:*

#### **Barvení Oil Red O:**

- |                             |                  |
|-----------------------------|------------------|
| 1) Oil Red O                | 15 minut         |
| 2) pramenitá voda           | oplach           |
| 3) Gill hematoxylin         | asi 5 sekund, RT |
| 4) pramenitá voda           | modrání 1 minuta |
| 5) montování nevodné medium |                  |

Zásobní roztok Oil Red O se připraví rozpuštěním 0,5 g Oil Red O ve 100 ml isopropanolu. Pracovní roztok se připravuje v čas potřeby z 60 ml zásobního roztoku smíchaného se 40 ml destilované vody a filtruje se přes papírový filtr.

### **7.4.Kvantitativní analýza barvení olejovou červení**

K určení velikosti lézí bylo využito stereologických metod (76). Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez byl pro každé barvení vybrán náhodně, a pak se vybral každý desátý řez, takže bylo pro každé barvení použito pět řezů ke stereologickému odhadu. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 200 průsečíků mezi body sítě a aterosklerotickým plátem na jednu cévu. Odhadovaná plocha aterosklerotické léze (olejové červeně) se vypočetla podle vzorce:

$$estA = a * P$$

kde parametr  $a$  charakterizuje plochu příslušející jednomu testovacímu bodu a  $P$  je počet průsečíků mezi body testovací sítě a aterosklerotickou lézí (76).

## 7.5. Imunohistochemie

Tkáňové řezy byly vytvořeny v oblasti aortálního kmene a obsahovaly semilunární chlopně spolu s aortou. Byly nakrájeny na kryostatu na řezy tlusté 7  $\mu\text{m}$  a následně umístěny na podložní sklička pokrytá želatinou.

Pro detekci exprese Smad2 byla použita metodika Avidin-Biotin (ABC) s detekčním činidlem diaminobenzidinem (DAB), který v případě pozitivní reakce poskytuje hnědou barevnou reakci.

### *Protilátky*

Pro detekci Smad2 byla použita primární monoklonální protilátka rabbit Anti-Mouse p-Smad2 (ABCAM) ve zředění 1:50. Jako sekundární protilátka byla použita monoklonální protilátka goat anti-rabbit Ig (Vector laboratoires, USA) ve zředění 1:400.

### *Postup:*

Podložní sklička s tkáňovými řezy byla na 15 minut umístěna do roztoku acetonu uchovávaného při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Po krátkém oschnutí (15 minut) byl postup zopakován, čímž došlo k lepšímu přilnutí vzorku na skličko. Poté byly řezy opět krátce osušeny (15 minut), následně vloženy do roztoku PBS (2x5 minut) a připraveny pro analýzu. Nejprve byl nanesen 10 % roztok goat séra v PBS (30 minut) za účelem blokace nespecifických vazebných míst. Následně se řezy inkubovaly s roztoky anti-avidinu a anti-biotinu (Vector Laboratoires, USA). Poté byla provedena inkubace (1 hodina) s primární protilátkou při pokojové teplotě. Následoval oplach v roztoku PBS (2x5 minut) a patnáctiminutová inkubace v 3% roztoku  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Po dalším oplachu PBS (2x5 minut) byla nanesena sekundární protilátka (30 minut). Poté se řezy opět vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Dalším krokem bylo nanesení enzymu peroxidázy



konjugovaného s avidin-biotin komplexem. Následovalo přidání detekčního činidla DAB (Dako, Dánsko). V další fázi experimentu byly řezy opláchnuty v acetonu a odvodněny v aceton-xyleny (10:1, 3 minuty), aceton-xyleny (1:10, 3 minuty) a v xyleny (3x2 minuty). Na závěr byly řezy ukotveny pomocí Eukittu.

Fotodokumentace a digitalizace snímků z mikroskopu byla provedena za použití digitální kamery Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., Ottawa, Kanada) pomocí softwaru NIS (Labortory Imaging, Česká republika).

## **7.6. Statistická analýza**

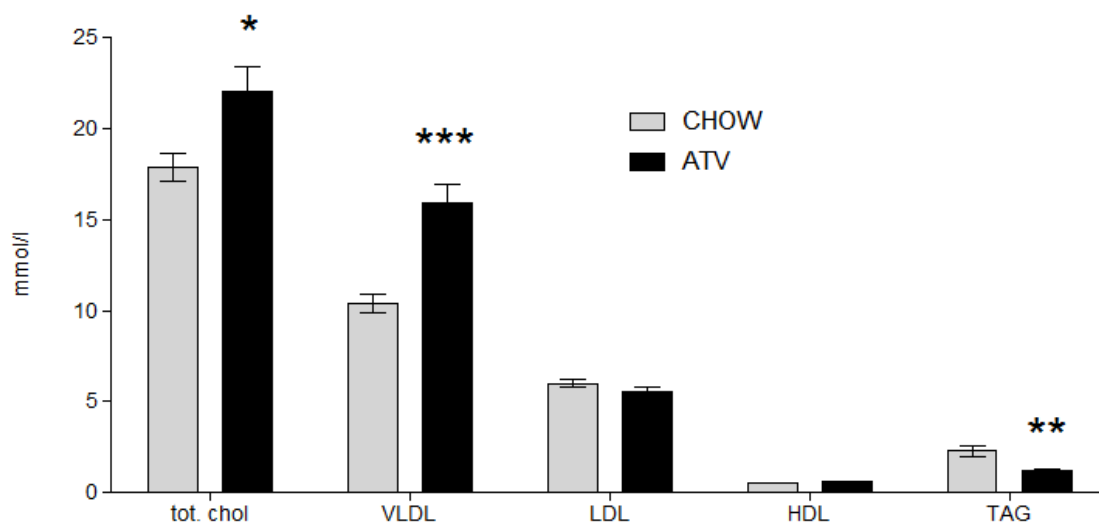
Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u skupin zvířat byl použit nepárový T test. Rozdíly byly statisticky významné v případě, že  $p \leq \alpha$ , kde  $\alpha=0,05$ . K výpočtu byl použit GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc, San Diego, California, USA).

## 8. VÝSLEDKY

### 8.1. Biochemická analýza hladin cholesterolu u myší

Biochemická analýza krevních vzorků ApoE/LDLr-deficitních myší prokázala, že podávání atorvastatinu v dávce 50 mg/kg denně způsobuje signifikantní nárůst hladin celkového cholesterolu ( $18 \pm 0.8$  vs.  $22 \pm 1.4$  mmol/l,  $p < 0.05$ ) a VLDL cholesterolu ( $10 \pm 0.5$  vs.  $16 \pm 1.0$  mmol/l,  $p < 0.001$ ) ve srovnání se zvířaty krmenými pouze standardní dietou bez ATV (Obr. 12). Naopak hladiny LDL ( $6.0 \pm 0.2$  vs.  $5.5 \pm 0.3$  mmol/l) a HDL ( $0.5 \pm 0.01$  vs.  $0.6 \pm 0.03$  mmol/l) nebyly atorvastatinem ovlivněny. Nicméně léčba ATV výrazně snižuje hladiny TAG ve srovnání s kontrolní (CHOW) skupinou ( $2.3 \pm 0.3$  vs.  $1.2 \pm 0.1$  mmol/l,  $p < 0.01$ ) (Obr. 12).

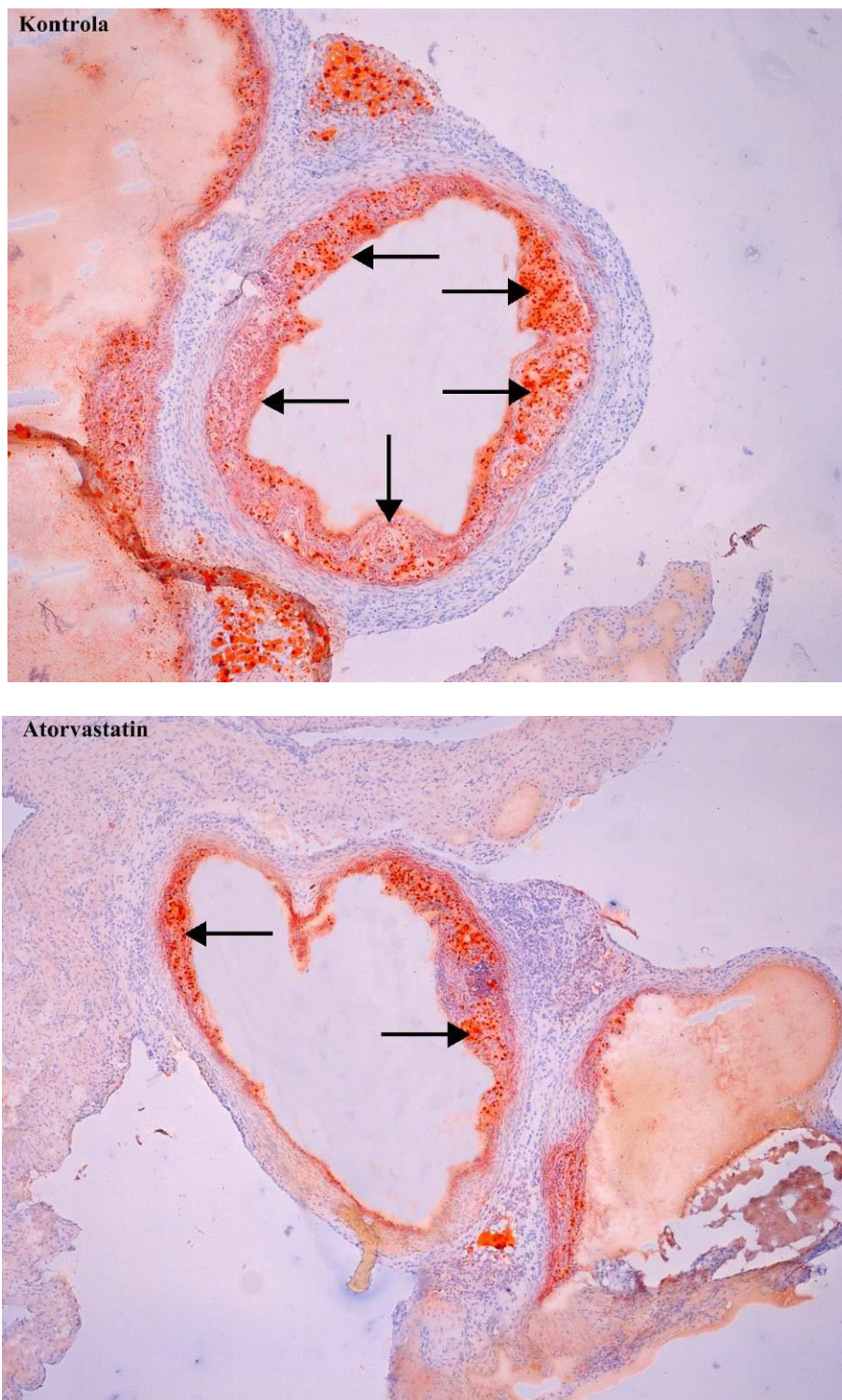
**Obr. 12: Hladiny cholesterolu u experimentálních myší (CHOW a ATV).** Léčba ATV výrazně zvyšovala hladiny celkového a VLDL cholesterolu při srovnání se zvířaty kontrolní skupiny, jimž byla podávána pouze standardní dieta. Nicméně hladiny LDL a HDL zůstaly po podávání ATV nezměněny. Hladiny TAG byly po léčbě ATV redukovány ve srovnání s kontrolní skupinou. Hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .



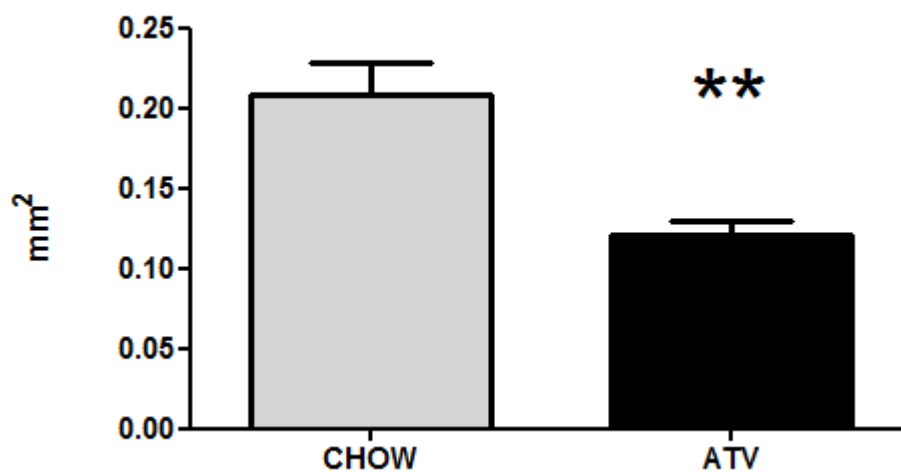
## **8.2.Kvantifikace velikosti aterosklerotických lézí**

Velikost aterosklerotických lézí barvených olejovou červení byla kvantifikována prostřednictvím stereologických metod. Velikost léze v aortálním sinu byla menší u myší léčených ATV (Obr. 13B) ve srovnání s kontrolní skupinou bez ATV (Obr. 13A). Kromě toho kvantitativní stereologická analýza barvení olejovou červení ukázala výrazný pokles olejové červeně u ATV skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou ( $0.2 \pm 0.01$  vs.  $0.1 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0.01$ ) (Obr. 14).

**Obr. 13: Reprezentativní obrázek barvení olejovou červení v aortálním sinu u kontrolní (A) a ATV (B) skupiny. ATV redukoval plochu barvení ve srovnání s kontrolní skupinou. Řezy byly kontrastně obarveny hematoxylinem. Zvětšeno 40x.**



**Obr. 14: Stereologická (kvantitativní) analýza velikosti lézí (olejová červeň) v oblasti aortálního sinu u kontrolní a ATV skupiny. ATV výrazně snižoval oblast barvení olejovou červí ve srovnání s kontrolní skupinou. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině,  $**p < 0.01$ .**



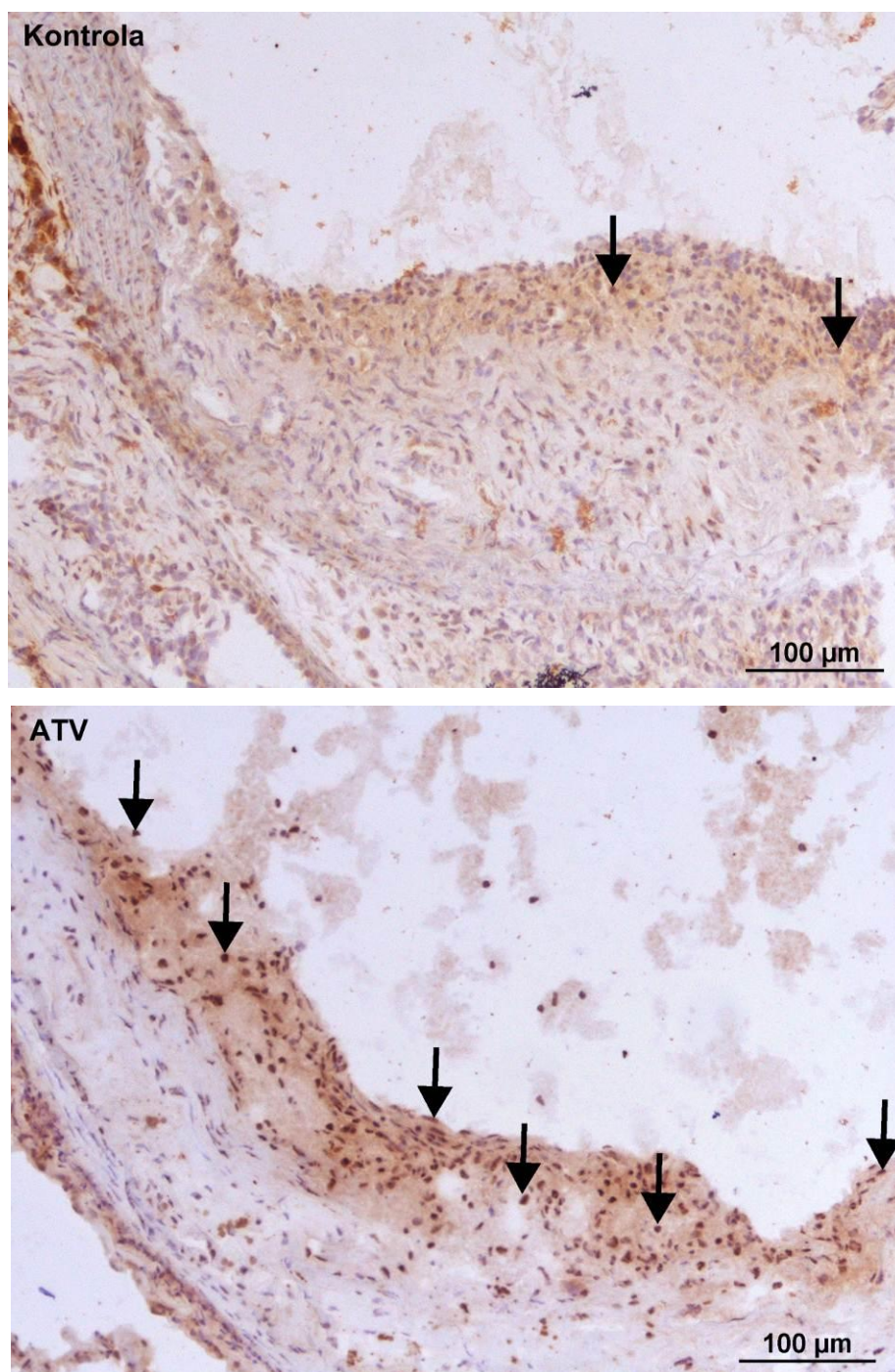
### **8.3.Imunohistochemické barvení u myší**

Imunohistochemické barvení bylo provedeno v aortálním sinu všech myší. Zaměřili jsme se na expresi Smad2 v aterosklerotických plátech, tunica media a v endotelu myší aorty.

Fosforylovaná forma Smad2 byla nalezena v buněčných jádrech. Exprese byla pozorovatelná v tunica adventitia, tunica media, v aterosklerotických lézích a také v endotelu. Intenzita barvení Smad2 (pozitivní jádra) byla silnější po podávání ATV ve srovnání s kontrolní skupinou (Obr. 15).



**Obr. 15: Reprezentativní obrázek popisující oblasti exprese Smad2 u kontrolní a ATV skupiny.** Pozitivita Smad2 exprese byla zjištěna v buněčných jádrech (šipky). Expres byla viditelná v tunica adventitia, tunica media, v aterosklerotických lézích a také v endotelu. Kromě toho intenzita barvení Smad2 (pozitivní jádra) byla silnější u ATV skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou. Řezy byly kontrastně obarveny hematoxylinem. Měřítka je 100  $\mu\text{m}$ .





## 9. DISKUZE

Transformující růstový faktor je multifunkční cytokin, člen rodiny strukturálně podobných polypeptidů označované jako „transforming growth factor superfamily“, který se podílí na řadě regulačních činností souvisejících s proliferací, diferenciací, migrací a přežíváním různých buněk v lidském těle (77). TGF- $\beta$  působí prostřednictvím svých receptorů a tzv. Smad proteinů. Finálním krokem signalizační kaskády TGF- $\beta$  je translokace aktivních komplexů Smad do jádra, kde modulují expresi příslušných genů, většinou ve spolupráci s různými koaktivátory a korepresory (78). Několik prací z posledních let popsalo význam Smad2 v procesu humánní i experimentální aterogeneze (37,79,80).

Cílem této rigorózní práce bylo popsat změny exprese fosforylované formy Smad2 v aterosklerotických plátech po podávání atorvastatinu u apoE/LDLr-deficitních myší.

Léčba atorvastatinem v dávce 50 mg/kg denně po dobu 8 týdnů vedla k výraznému nárůstu hladin cholesterolu u myší léčených atorvastatinem. Tento hypercholesterolemický efekt byl již dříve popsán (81), avšak je v rozporu s dřívější studií, kde léčba ATV s „western-type“ dietou vedla k silnému hypolipidemickému efektu (82). Tyto výsledky naznačují, že experimentální dieta může dramaticky změnit působení ATV na hladiny cholesterolu u ApoE/LDLr-deficitních myší. Nicméně tento biochemický jev nabízí možnost studovat tzv. pleiotropní účinky atorvastatinu v této studii.

V dalším kroku jsme studovali oblast aterosklerotické léze v aortálním sinu. I přes hypercholesterolemický efekt ATV oblast léze byla redukována, což naznačuje zapojení nelipidových účinků ATV, jak bylo již dříve publikováno u myší (81).

Imunohistochemická analýza dále prokázala velmi slabou expresi Smad2 u zvířat z kontrolní skupiny. Toto je v souladu s výsledky jiných autorů, kteří poukazovali na pokles exprese Smad2 v aterosklerotických plátech během aterogeneze, což by mělo naznačovat inhibici efektů TGF- $\beta$ 1 signalizace jako je např. inhibice zánětu (83). Podávání atorvastatinu významně zvýšilo expresi fosforylované formy Smad2 a to jak v medii, tak v celém plátu. Tyto výsledky imunohistochemické analýzy byly později potvrzeny Western blot analýzou (Večeřová et al. publikace v tisku). Toto zvyšování

exprese Smad2 by mohlo vést k řadě pozitivních efektů. Některé studie totiž prokázaly, že fosforylace a tedy aktivace Smad2 vede ke zvyšování exprese endotel-protektivní endoteliální NO syntázy (80). Dále se ukázalo, že Smad2 inhibuje zánětlivou reakci prostřednictvím inhibice NFkB (84). Další studie navíc prokázala zvyšování produkce extracelulární matrix a stabilizaci aterosklerotických plátů po aktivaci Smad2 v lidských aterosklerotických plátech (85).

V této rigorózní práci jsme prokázali, že zvýšená exprese Smad2 je spojena se snížením velikosti plátů po podání atorvastatinu a to bez jeho hypolipidemických účinků. Tento efekt tedy může představovat potenciální mechanismus účinku statinů na proces aterogeneze.

## 10. ZÁVĚR

Tato rigorózní práce se zaměřila na sledování vlivu podávání atorvastatinu na expresi fosforylované formy Smad2 v aterosklerotických plátech u hypercholesterolemických apoE/LDLr-deficitních myší.

Podávání atorvastatinu v dávce 50 mg/kg/den pro každé zvíře vedlo k signifikantnímu zvýšení hladin cholesterolu a VLDL cholesterolu.

Navzdory hypercholesterolemickému účinku atorvastatinu dále došlo také k poklesu velikosti aterosklerotických plátů.

Imunohistochemická analýza prokázala expresi Smad2 v celé stěně aorty včetně endotelu, plátu a cévní medie.

Podávání atorvastatinu dále vedlo ke zvýšení exprese Smad2 v porovnání s neléčenou skupinou.

Vzhledem k tomu, že bylo prokázáno, že Smad2 má výrazné protizánětlivé účinky, endotel-protektivní a plát stabilizující účinky, lze usuzovat, že zvyšování exprese Smad2 po podávání statinů by mohlo přispívat k jejich antiaterogenním účinkům.

## 11. SEZNAM ZKRATEK

AII	angiotenzin II
AH	arteriální hypertenze
ALK	aktivin receptor-like kináza
ApoB	apolipoprotein B
ApoE	apolipoprotein E
ApoE <sup>-/-</sup>	apoE deficitní myši
ApoE/LDLr	apoE a LDL-receptor
ATV	atorvastatin
BMI	body-mass index
BMP	kostní růstový protein, bone morphogenetic protein
CMP	cévní mozková příhoda
Co-Smads	„common-partner“ Smads
CRP	C-reaktivní protein
DAB	diaminobenzidin
EDRF	endothelium-derived relaxing factor, endotelový relaxační faktor
eNOS	endoteliální NO-syntáza
FGF	růstový faktor fibroblastů, fibroblast growth factor
GM-CSF	faktor stimulující kolonie makrofágů a granulocytů
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl-koenzymA
ICAM-1	intracelulární adhezní molekula
IL-1	interleukin-1
ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
ICHs	ischemická choroba srdeční
I-Smads	inhibitory Smads
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
LDLr <sup>-/-</sup>	LDL-receptor deficitní myš
MCP-1	monocyty přitahující protein
M-CSF	faktor stimulující kolonie makrofágů
MH1, MH2	Mad-homology doména
MMPs	matrixové metaloproteinasy

NO-syntáza	syntáza oxidu dusnatého
nNOS	NO-syntáza nervových buněk
oxLDL	oxidovaný LDL
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu-1
PDGF	destičkový růstový faktor
R-Smads	receptory-regulované Smads
SARA	Smad anchor for receptor activation
SCORE	odhad koronárního rizika, systematic coronary risk evaluation
Smad	intracelulární mediátory zprostředkující signalizaci TGF- $\beta$
TAG	triacylglyceroly
T $\beta$ RI, T $\beta$ RII	receptor pro TGF- $\beta$ typu I a typu II
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor- $\beta$
TIMP	tkáňový inhibitor metaloproteináz
TK	krevní tlak
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor alfa
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
VCAM-1	adhezní molekula-1 cévních buněk
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě

## 12. POUŽITÁ LITERATURA

1. Býma S, Hradec J: *Prevence kardiovaskulárních onemocnění* (Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře 2009); Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2009, ISBN: 978-80-86998-32-9
2. Vlček J, Fialová D: *Klinická farmacie I.*, Grada, Praha 2010, s.73-221, ISBN 978-80-247-3169-8
3. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease, *N Engl J Med* 1999, 340: 115-126
4. Kalousová M a kol.: *Patobiochemie ve schématech*, Grada Publishing a.s., 2006, s.129-138, ISBN 80-247-1522-8
5. Vrablík M: Kardiovaskulární onemocnění a hypolipidemická léčba; *Med.pro praxi*, 2007, 2: 70-72
6. Vrablík M, Janotová M, Motyková E, Prusíková M: Endoteliální dysfunkce – první stadium aterosklerózy; *Medicina pro praxi*, 2011, 8(3): 119-122
7. <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/poruchy-tukoveho-metabolismu-u-deti-a-dorostu-a-moznosti-jejich--173367> (10.7.2011)
8. Štejfá M: *Kardiologie*; Grada Publishing a.s., 2007, s.213-222, ISBN: 978-80-247-1385-4
9. Glasser SP, Selwyn AP, Ganz P: Atherosclerosis: risk factors and the vascular endothelium; *Am Heart J*, 1996, 131: 379-384
10. Mandovec A: *Kardiovaskulární choroby u žen*; Grada Publishing a.s., 2008, s.21-55, ISBN: 978-80-247-2807-0
11. Boyle EM Jr, Lille ST, Allaire E, Clowes AW, Verrier ED: Atherosclerosis, Endothelial cell injury supplement; *The annals of thoracic Surgery*, 1997, 64: 47-56
12. Perušičová J, Šmahelová A: Chronické komplikace u diabetes mellitus (1.část); *Interní medicína pro praxi*, 2001/1, s.34-38
13. Karen I, Škrha J, Býma S, Kvapil M, Herber O: *Diabetes mellitus* (Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře); Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2009, ISBN: 978-80-86998-30-5
14. Ashermann M, Linhart A: Kouření a kardiovaskulární onemocnění; *Cor Vasa* 2010, 52(9): 500-505

15. Ylä-Herttuala et al: Stabilisation of atherosclerotic plaques; *Thromb Haemost* 2011; 106: 1-19
16. Valtonen VV: Role of infections in atherosclerosis; *Am Heart J*, 1999, 138: 431-433
17. Langmeier M a kol: *Základy lékařské fyziologie*, Grada Publishing a.s., 2009, s.161, ISBN: 978-80-247-2526-0
18. <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Lipoprotein.png> (18.6.2011)
19. <http://www.lfhk.cuni.cz/rezacovam/lipoprot/lipoprot.htm> (18.6.2011)
20. Vojáček J, Malý M a kol.: *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*, Grada Publishing a.s., 2004, s.21-42, ISBN 80-247-0501-X
21. Lincová D, Farghali et al: *Základní a aplikovaná farmakologie*; Galen 2007, s.262-267, ISBN: 978-80-7262-373-0
22. Assmann G, Gotto AM Jr: HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis; *Circulation* 2004; 109: III-8-III-14
23. [http://www.medscape.com/viewarticle/574506\\_4](http://www.medscape.com/viewarticle/574506_4) (11.7.2011)
24. Douglas G, Channon KM: The pathogenesis of atherosclerosis; *Medicine*, 2010, 38: 397-402
25. Masopust J, Průša R: *Patobiochemie buňky*; 2. Lékařská fakulta UK, Praha, 2003, s.89-100, ISBN: 80-239-1011-0
26. Vrablík M: Endoteliální dysfunkce – první a ovlivnitelné stadium aterosklerózy; *Practicus* 5/2009, s.28-30
27. Watanabe N, Ikeda U: Matrix metalloproteinases and atherosclerosis; *Current Atherosclerosis reports* 2004, 6: 112-120
28. Schäfers M, Schober O, Hermann S: Matrix-metalloproteinases as imaging targets for inflammatory activity in atherosclerotic plaques; *The Journal of nuclear medicine*, 2010, 51(5): 663-666
29. <http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/erektilni-dysfunkce-a-metabolicky-syndrom-413036> (30.6.2011)
30. George SJ, Johnson J: *Atherosclerosis: Molecular and cellular mechanisms*, Wiley-VCH Verlag GmbH Co 2010, s. 13-14, ISBN 978-3-527-32448-4
31. Badimon L, Storey RF, Vilahur G: Update on lipids, inflammation and atherothrombosis; *Thrombosis and haemostasis supplement*, Schattauer 2011, s.34-42

32. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME Jr., Schaffer SA, Schwarz CJ, Wagner WD and Wissler RW: A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis; *Arterioscler Thromb*, 1994, 14: 840-856
33. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis, *Circulation* 1995, 92:1355-1374
34. <http://img.medscape.com/slide/migrated/editorial/cmecircle/2004/3549/images/slide009.gif> (12.7.2011)
35. Osmančík P: Společná etiopatogeneza akutních koronárních syndromů; *Kardioforum* 2/2003, [www.kardiologickeforum.cz](http://www.kardiologickeforum.cz)
36. <http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/30/15/1844/F6.expansion> (20.6.2011)
37. Feinberg MW, Jain MK: Role of transforming growth factor-beta 1/Smads in regulation vascular inflammation and atherogenesis; *Panminerva Med* 2005, 47: 169-186
38. Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR et al: The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med* 1995, 1:74-79
39. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB: Making sense of latent TGFbeta activation; *J Cell Sci* 2003, 116: 217-224
40. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, ten Dijke P: TGF- $\beta$  receptor function in the endothelium; *Cardiovascular research* 2005, 65: 599-608
41. Goumans M-J, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P: Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- $\beta$  type 1 receptors; *EMBO J*, 2002, 21:1743-1753
42. McCaffrey TA, Consigli S, Du B, Falcone DJ, Sanborn TA, Spokojny AM et al: Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-beta1; *J Clin Invest* 1995, 96: 2667-2675
43. <http://www.bioscience.org/2009/v1s/af/32/figures.htm> (10.7.2011)
44. Kloos DU, Choi C, Wingender E: The TGF- $\beta$ -Smad network: introducing bioinformatic tools; *Trends in genetics*, 2002, 18: 96-103



45. [http://hormones.gr/preview.php?c\\_id=194](http://hormones.gr/preview.php?c_id=194) (30.6.2011)
46. Datto MB, Frederick JP, Pan L, Borton AJ, Zhuang Y, Wang XF: Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction; *Mol Cell Biol* 1999, 19:2495-2504
47. Feinberg MW, Watanabe M, Lebedeva MA, Depina AS, Hanai J, Mammoto T et al: Transforming growth factor-beta 1 inhibition of vascular smooth muscle cell activation is mediated via Smad3; *J Biol Chem* 2004, 279: 16388-16393
48. Gotto AM Jr.: Risks and benefits of continued aggressive statin therapy; *Clin Cardiol* 2003; 26: III3-12
49. Vrablík M, Česka R: Od lipidologie ke kardiologii; *Klin Farmakol Farm* 2005, 19: 149-151
50. Goláš L.: Chyby a úskalí terapie statiny; II.interní klinika 1.LF UK a VFN, Praha, *Interní medicína pro praktické lékaře* 1/2004, s.31-32
51. Lüllmann H, Mohr K, Wehling M: *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání*, Grada Publishing 2004, s.240-241
52. Paluch Z., Heřmánková Z: Interní medicína pro praxi, *Interní Med.* 2010; 12(10): 479–481
53. Tošovský M., Bláha V.: *Česká geriatrická revue*, 4/2004, s.22-26
54. Górecká K., Tilšer I., Nachtigal P., Kopecký M.: Extralipidové účinky statinů – nový pohled na farmakodynamiku inhibitorů HMG-CoA reduktázy; *Remedia*, 4/2004
55. Liao JK: Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection; *Int J Cardiol* 2002; 86: 5-18
56. Crisby M., Nordin-Frederiksson G., Shah PK, et al.: Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization; *Circulation* 2001; 103: 926-933
57. Rauch U, Osende JJ, Chesebro JH, Fuster V, Vorchheimer DA, Harris K, Harris P, Sandler DA, Fallon JT, Jayaraman S, Badimon JJ: Statins and cardiovascular diseases: the multiple effects of lipid-lowering therapy by statins; *Atherosclerosis* November 2000; 153(1): 181-189
58. Takemoto M, Liao JK: Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors; *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1712-1719

59. Bellosta S. et al: Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors; *Atherosclerosis* April 1998; 137(1): 101-109
60. Pella D, Vargová V, Fedačko J, Raši R: Statíny – majú dominantné miesto v kardiovaskulárnej prevencii? Lipidy znižujúce a pleiotropné účinky statínov; *Med.pro praxi*, 2007, 5:195-199
61. Ignatowski AC: Influence of animal food on the organism of rabbits. *S Peterb Izviest Imp Voyenno-Med.Akad* 1908; 16: 154 - 173
62. Drobnik J, Dabrowski R, Szczepanowska A, Giernat L, Lorenc J: Response of aorta connective tissue matrix to injury caused by vasopressin – induced hypertension or hypercholesterolemia; *J Physiol Pharmacol* 2000; 51: 521 – 533
63. Jawien J, Nastalek P, Korbut R: Mouse models of experimental atherosclerosis; *Journal of physiology and pharmacology* 2004, 55(3): 503 – 517
64. Daugherty A: Mouse Model of Atherosclerosis, *The American Journal of the medical Sciences*, January 2002, 323: 3-10
65. Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM, Kooistra T: Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers; *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1706-1721
66. Liao F, Andalibi A, deBeer FC et al: Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice; *J Clin Invest* 1993, 91: 2572-2579
67. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N: Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E; *Science* 1992; 258: 468 – 471.
68. Davignon J: Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect; *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 267 - 269
69. Raffai RL, Loeb SM, Weisgraber KH: Apolipoprotein E promotes the regression of atherosclerosis independently of lowering plasma cholesterol levels; *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 436 – 441
70. Ali K, Middleton M, Pure E, Rader DJ: Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo; *Circ Res.* 2005; 97: 922 – 927
71. Grainger DJ, Reckless J, McKilligin E: Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice; *J Immunol.* 2004; 173: 6366 – 6375

72. Tenger C, Zhou X: Apolipoprotein E modulates immune activation by acting on the antigen-presenting cell; *Immunology* 2003; 109: 392 – 397
73. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross S: ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree; *Arterioscler Thromb*.1994; 14: 133 – 140
74. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J: Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus – mediated gene delivery; *J Clin Invest* 1993; 92: 883 – 893
75. Knowles JW, Maeda N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice; *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2336 – 2345
76. Nachtigal P, Semecky V, Kopecky M, Gojova A, Solichova D, Zdansky P and Zadak Z: Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis; *Pathol Res Pract*; 2004, 200: 219-229.
77. Chen B, Peng X, Pentassuglia L, Lim CC and Sawyer DB: Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity; *Cardiovasc Toxicol* 2007; 7: 114-121.
78. Saura M, Zaragoza C, Cao W, Bao C, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D and Lowenstein CJ: Smad2 mediates transforming growth factor-beta induction of endothelial nitric oxide synthase expression; *Circ Res* 2002; 91: 806-813.
79. Nachtigal P, Vecerova L, Pospisilova N, Micuda S, Brcakova E, Navarro Hernandez E, Pospechova K and Semecky V: Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: an immunohistochemical study; 2009; *Histol Histopathol*, 24: 1499-1506.
80. Santibanez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, Silvestri C, Saura M, Vary CP, Lopez-Novoa JM, Attisano L and Bernabeu C: Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling; 2007; *J Cell Physiol* 210: 456-468.
81. Choudhury RP, Carrelli AL, Stern JD, Chereshev I, Soccio R, Elmalem VI, Fallon JT, Fisher EA and Reis ED: Effects of simvastatin on plasma lipoproteins and response to arterial injury in wild-type and apolipoprotein-E-deficient mice; *J Vasc Res*; 2004, 41: 75-83.

82. Nachtigal P, Pospisilova N, Vecerova L, Micuda S, Brcakova E, Pospechova K and Semecky V: Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice; 2009; *J Atheroscler Thromb*, 16: 265-274.
83. ten Dijke P and Hill CS: New insights into TGF-beta-Smad signalling; 2004; *Trends Biochem Sci*, 29: 265-273.
84. Rodriguez-Vita J, Sanchez-Galan E, Santamaria B, Sanchez-Lopez E, Rodrigues-Diez R, Blanco-Colio LM, Egido J, Ortiz A and Ruiz-Ortega M: Essential role of TGF-beta/Smad pathway on statin dependent vascular smooth muscle cell regulation; 2008; *PLoS One*, 3: 1-14
85. Bot PT, Hoefer IE, Sluijter JP, van Vliet P, Smits AM, Lebrin F, Moll F, de Vries JP, Doevendans P, Piek JJ, Pasterkamp G and Goumans MJ: Increased expression of the transforming growth factor-beta signaling pathway, endoglin, and early growth response-1 in stable plaques; 2009; *Stroke*, 40: 439-447.